

**ZUR RATTENPYELONEPHRITIS: INJEKTION  
VON LIPOPOLYSACCHARID (ENDOTOXIN)  
AUS ESCHERICHIA COLI UND SALMONELLA  
KEIMEN. VERGLEICHENDE HISTO-  
PATHOLOGISCHE UND IMMUNFLUORESCENZ-  
MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN.**

Karl-Heinz Beinker

1973





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553807\\_0046](https://archive.org/details/IA41553807_0046)



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Marget
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Betke
3. Berichterstatter: Priv.Do. Dr. H.H. Edel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1973

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                       | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. EINLEITUNG                                                                         | 1     |
| B. MATERIAL                                                                           | 5     |
| C. METHODISCHE GRUNDLAGEN                                                             | 8     |
| 1. Operationen                                                                        | 8     |
| 2. Blutentnahme bei Ratten                                                            | 10    |
| 3. Entnahme der Nieren                                                                | 10    |
| 4. Serumgewinnung                                                                     | 11    |
| 5. O-Antigen Gewinnung zur Kaninchenimmunisierung                                     | 11    |
| 6. Immunisierung der Kaninchen                                                        | 12    |
| 7. Totale Blutentnahme beim Kaninchen                                                 | 12    |
| 8. Antikörpertiterbestimmung nach Widal                                               | 12    |
| 9. Antikörpertiterbestimmung nach der Hämagglutinationsmethode                        | 13    |
| 10. Kaninchenserumfraktionierung                                                      | 13    |
| 10.1 Ammoniumsulfatfällung                                                            | 13    |
| 10.2 Dialyse zum Austausch der $\text{NH}_4^+$ und $\text{SO}_4^{--}$ Ionen           | 14    |
| 10.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE <sup>4</sup> Zellulose zur Ig-G Gewinnung  | 14    |
| 11. Markierung der Ig-G Fraktion mit FITC, Dialysemethode                             | 15    |
| 11.1 Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung                                       | 15    |
| 11.2 FITC Markierungs-dialyse des Ig-G                                                | 15    |
| 11.3 Abtrennung des nicht gebundenen FITC (Gel-Filtration)                            | 16    |
| 11.4 Fraktionierung des markierten Ig-G in versch. Konjugationsgrade                  | 16    |
| 12. Immunfluoreszenzhistologie                                                        | 17    |
| 12.1 Herstellung der Gefrierschnitte                                                  | 17    |
| 12.2 Immunfluoreszenzfärbung                                                          | 17    |
| 13. HE Färbung                                                                        | 18    |
| 14. LPS Adsorption an Erythrocyten                                                    | 18    |
| D. ERGEBNISSE der VERSUCHSMETHODIK                                                    | 18    |
| I. Tierexperimente                                                                    | 18    |
| 1. Injektion von Endotoxin, lebende Bakterien oder NaCl bei Ratten                    | 18    |
| 2. Rattenexperimente                                                                  | 20    |
| 3. Titer der Ak-Seren bei Kaninchen durch Injektion von O-Antigenen                   | 21    |
| 4. Immunologische Situation der Ratten                                                | 22    |
| II. Das Immunfluoreszenzserum (Ig-G Fraktion)                                         | 23    |
| 1. Serumfraktionierung                                                                | 23    |
| 2. Fluoreszenzmarkierung der Ig-G Fraktion                                            | 24    |
| 3. Kontrollen zur Spezifität der Ig-G Seren                                           | 25    |
| 3.1 Ig-G IF-Seren ausgetestet gegen E.c. und S.a.e. Antigen                           | 25    |
| 3.2 Ig-G IF-Seren ausgetestet gegen LPS beladene Erythrocyten                         | 26    |
| 3.3 Ig-G IF-Seren ausgetestet gegen Antigenpositive Nierenschnitte                    | 27    |
| 3.4 Spezifität der Antiseren, die sich aus den Kontrollen zur Immunhistologie ergeben | 29    |

|                                                                                                  | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| E. HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE                                                                      |       |
| I. Immunhistologie                                                                               | 30    |
| 1. Quantitative Auswertung der IF-Mikroskopischen Ergebnisse                                     | 31    |
| 2. Vergleich der IF-Ergebnisse an Hand der Schaubilder 1 - 4                                     | 33    |
| 3. Qualitative Auswertung der IF-Mikroskopischen Ergebnisse                                      | 36    |
| 4. Synoptische Beschreibung der quantitativen und qualitativen Ergebnisse in Abschnitt 2. und 3. | 39    |
| II. Pathologische Auswertung der HE Präparate                                                    | 39    |
| III. Vergleiche der immunhistologischen mit den pathologischen Ergebnissen                       | 42    |
| F. DISKUSSION                                                                                    | 44    |
| G. ZUSAMMENFASSUNG der ERGEBNISSE                                                                | 50    |
| H. TABELLEN, SCHAUBILDER und FOTOS                                                               | 54    |
| I. LITERATURVERZEICHNIS                                                                          | 68    |
| J. DANKSAGUNG                                                                                    |       |
| K. LEBENS LAUF                                                                                   |       |

## A. EINLEITUNG

Die Pyelonephritis (PN) ist in ihren verschiedenen Ausprägungsformen die häufigste Nierenerkrankung (Fuchs 1969). Schon seit dem Jahre 1908 ist bekannt, daß vor allem Säuglings und Kleinkinder von Harnwegsinfektionen bedroht sind (Göppert 1908). Diese Infektionen führen in großem Maß zu einer Pyelonephritis (Rohwedder 1966; Wichmann, Marget 1971; Windberg et al. 1971; Marget 1972), die oft erst im Erwachsenenalter manifest werden können (Mildenberger et al. 1966).

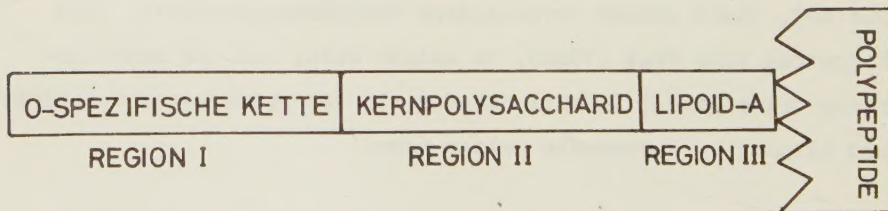
Wie es jedoch dazu kommt, daß über so einen langen Zeitraum die Pyelonephritis in ihrer chronischen Form sich fortentwickelt, oft ohne charakteristische Symptome oder ohne neuerliche oder seltene Infektion der Harnwege (Angnell et al. 1968; Aoki et al. 1969), ist nicht bekannt. Um die Pathogenese der Pyelonephritis zu klären, wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen unternommen. Das Schwergewicht lag dabei auf der Erzeugung experimenteller Pyelonephritiden bei Versuchstieren (vor allem Ratten). Dabei wurden verschiedene Verfahren angewandt. Eine Übersicht gibt Prat (1966). Es zeigte sich, daß der aufsteigende (retrograde) Infektionsmodus als der erfolgversprechendste und klinisch relevanteste gelten kann.

Als induzierendes Agens bediente man sich dabei der verschiedensten Keime - lebend oder tot. *E. coli* Keime konnten bei den bakteriologischen Untersuchungen als die bei weitem am häufig-

sten auftretenden Erreger in Verbindung mit einer Pyelonephritis bestimmt werden (Kienitz 1966).

In tierexperimentellen Untersuchungen waren auch abgetötete Bakterien in der Lage, ein Pyelonephritis ähnliches Bild auszulösen (McCabe 1961; Sarre 1966; Aoki et al. 1967). Pyelonephritische Veränderungen waren also nicht an den bakteriellen Stoffwechsel gebunden, sondern mußten mit den endotoxischen oder antigenen Eigenschaften der Bakterienreste korrelieren. Als hierfür verantwortliche Faktoren boten sich die Endotoxine der Bakterien, bzw. die Lipopolysaccharide (LPS) an (Westphal et al. 1952; 1972), die in der Lage sind, höchst komplexe biologische Reaktionen auszulösen (s.u.).

Lipopolysaccharide bilden die äußerste Schicht von bestimmten Bakterienarten. Bei den S-Formen (Charakteristikum des Koloniewachstums) ließ sich folgendes allgemeines Bauprinzip erkennen (Lüderitz 1970; Nowotny 1971; Westphal 1971 geben Zusammenfassungen für die folgenden Ausführungen).



Figur 1: Aufbau der Lipopolysaccharide mit der Verknüpfung zur Bakterienzellwand (schematisch). (nach Lüderitz 1970 und Nowotny 1971, verändert)

Die O - Spezifische Kette (Region I) beinhaltet Speziesspezifische Polysaccharide, die die O - Antigenität bewirken (Serotyp). Diese Eigenschaft hat ihren Niederschlag im Kauffmann - White - Schema gefunden (Kauffmann 1966). Dem Chemotyp entspricht jeweils ein Serotyp, der besonders bei Salmonellenarten aufgeklärt werden konnte. Die Region I repräsentiert also einen Teil der biologischen Aktivitäten der Lipopolysaccharide: die Speziespezifische Antigenität (Antikörperbildung, Phagenadsorption).

Die Region II der Lipopolysaccharide befindet sich bei den S - Formen zwischen den beiden anderen Regionen, besitzt jedoch bei den R - Formen (Mutanten, die von S - Formen abgeleitet werden können, R I fehlt) Antigenität. Chemisch besteht dieser Bereich aus fünf (oder weniger) Zuckern, die in allen Salmonellenarten vorkommen (basale Zucker).

Das Lipoid-A (Region III) konnte in seiner Struktur aufgeklärt werden (siehe auch Rietschel 1971). Es ist nur in Verbindung mit hydrophilen Molekülteilchen wasserlöslich. Das endotoxische Prinzip der Lipopolysaccharide stellt das Lipoid-A dar, wie es schon 1954 von Westphal und Lüderitz postuliert wurde. Dies wurde besonders eindeutig, als es gelang, Lipoid-A an Rinderserumalbumin zu binden, ohne die biologische Aktivität zu beeinträchtigen (Galanos et al. 1971), und chemisch oder enzymatisch verändertes Lipoid-A sich in Toxizitätsversuchen als inaktiv erwies (Malchow et al. 1969; Nowotny 1971). Über die Antigenität

des Lipoid-A wurden widersprüchliche Angaben gemacht. Es ließ sich bestätigen, daß Antikörper gegen Lipoid-A gebildet werden können (Rank 1969; Rank et al. 1971; Galanos 1972).

Die biologischen Aktivitäten, die auf die Region III zurückgehen, sind:

Fiebererzeugung, Veränderungen im weißen Blutbild und in der Blutgerinnung, Adjuvanswirkung, Adaptation, Tumornekrose, Toxizität, Complementbindung, Produktion leukotaktischer Substanzen, Einwirkungen auf Blutdruck und -zirkulation, Stimulierung der unspezifischen Immunität, Knochenmarksirritation, Schutzeffekt gegen Röntgenstrahlung, Interferonaktivierung.

Von Watson und Kim (1964) wurden die biologischen Phänomene eingeteilt in eine "primary toxicity", die auf den Lipidanteil zurückgeführt wird (obige Zusammenstellung), und eine "secondary toxicity", die sich aus immunologischen Reaktionen ergibt (z.B. Ag - Ak - C' Reaktionen gegen R I). Die Angaben über toxische Lipopolysaccharidkonzentrationen schwanken je nach Gewinnungstechnik und Tierart. Dies ist bei der Beurteilung der biologischen Wertigkeit von Lipopolysacchariden zu berücksichtigen.

Die meisten biochemischen Ergebnisse über endotoxische Lipopolysaccharide sind bei Salmonellen gewonnen worden, die jedoch für die Entstehung einer Pyelonephritis beim Menschen unbedeutend sind (Kienitz 1966). Im Vergleich Salmonella- mit E. coli-Lipopolysacchariden, die sich in der endotoxischen Komponente (Lipoid-A) vermutlich nicht unterscheiden (Lüderitz 1970), sollen etwaige Unterschiede in der Aktivität aufgezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit ist als Vorstudie (Pilot - Studie) für Untersuchungen zur Pathogenese der Pyelonephritis gedacht, die in der Kinderklinik der Universität München inzwischen angelaufen sind. Es soll geklärt werden, ob Lipopolysaccharide - wie abgetötete Bakterienkeime - in der Rattenniere pyelonephritische Veränderungen zu induzieren vermögen. Es bestanden Fragestellungen bezüglich der Methodik, des Penetrationsverhaltens von Lipopolysaccharid in das Nierengewebe, der Lokalisation des Lipopolysaccharids in der Niere (Immunfluoreszenz- und HE- Histologie), der Konzentrationsabhängigkeit, der immunologischen Reaktion der behandelten Tiere, des Einflusses auf die nicht behandelte Gegenniere und der Spezifität der Lipopolysaccharide.

Von der Fragestellung her erschien es sinnvoll, die Untersuchungen in Material, Methodische Grundlagen, in Ergebnisse der Versuchsmethodik und Histologische Ergebnisse aufzugliedern.

## B. MATERIAL

### Versuchstiere

Wistaratten, weiblich ca. 300 g 37

Kaninchen ca. 2,5 - 3,0 kg 5

### Bakterien

Escherichia coli O:100 (EH 1.1) 1402 S-Form (E. coli)<sup>x)</sup>  
Salmonella abortus equi SF 1730 S-Form (S.a.e.)<sup>x)</sup>

### Endotoxin

Lipopolysaccharide (LPS) von den obigen Bakterienstämmen.<sup>x)</sup>

<sup>x)</sup> Die Stämme und LPS wurden uns freundlicher Weise von O. Westphal und O. Lüderitz, Institut für Immunbiologie der MPG, Freiburg, zur Verfügung gestellt. Dosierungen wurden entsprechend den Angaben dieser Arbeitsgruppe gewählt (Westphal, 1971).

### Eigenschaften der LPS

Sie sind im Wasser gut löslich, in physiologischer Kochsalzlösung dagegen schwer lösbar. Zum besseren Lösen ist Erhitzen auf 100°C für 2 - 3 min möglich.

### Medien

Bacto Standard - I - Agar, Vollmedium, nach Vorschrift

Bacto Standard - I - Nährboullion            nach Vorschrift

### Operationsmaterial

Gewebekleber, Acrylat

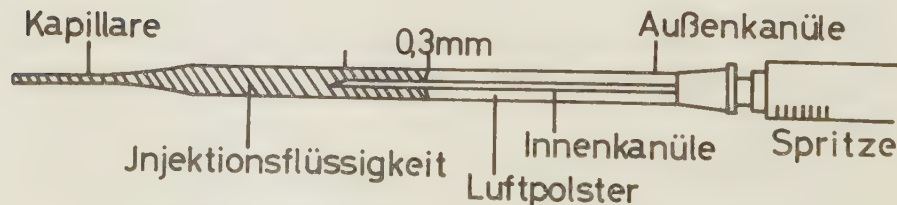
Cat - gut 03, 05

Seide                      05

### Sonden - Spritzenkombination

Auf eine 11er Binnalkanüle wurde eine ausgezogene und verkürzte Glaskapillare, die an der Spitze leicht angeschmolzen war, aufgeschweißt. Diese Kombination ergab mit einer 1 ml Tuberkulinspritze die Injektionsapparatur.

Zeichnung:



Material zur Ionenaustausch chromatographie und Immunfluoreszenz

Ammoniumsulfatlösung, gesättigt

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  380 g

in 500 ml aqua dest. unter Rühren und Erwärmen lösen und auskristallisieren lassen. Die notwendige Menge dieser Lösung filtrieren und mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  auf pH 7,0 einstellen. Diese Lösung bei 0°C aufbewahren.

Phosphatgepufferte Salzlösung

$\text{NaCl}$  8 g (0,14 m)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$  1,78 g (0,01 m)

mit 10 n  $\text{NaOH}$  (ca. 7 ml) auf pH 7,0 - 7,2 einstellen  
auffüllen auf 1000 ml aqua dest.  
ev. als Zusatz Merthiolat (1:10 000)

Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 0,01 m

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,36 g (0,01 m)

mit 10 n  $\text{NaOH}$  auf pH 8,0 einstellen  
auffüllen auf 1000 ml aqua dest.

Carbonat - Bi - Carbonatpuffer 0,5 m pH 9,0 - 9,3

$\text{NaHCO}_3$  3,7 g

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  (wasserfrei) 0,6 g

ad 100 ml aqua dest.

Zum Gebrauch 1/20 verdünnen auf 0,025 m

Fluoreszein-Isothiocynat (FITC), Fa. BBL, USA.

CEAE - Cellulose Typ SH

Sephadex G 25<sub>coarse</sub> Gel

DEAE - Sephadex A 50

### Immunfluoreszenzmikroskopie

Mikroskop: Zeiss UV - Auflichtmikroskop

Anregung: CSI - Lampe

Teilerplättchen Fl 500

Sperrfilter 50

1 Filter KP 600 Interferenz, Rotlichtunterdrückung

2 Erregerfilter 2 KP 500 Interferenz

### Industrielle Immunfluoreszenzseren

Escherichia coli anti OK(B), polyvalent I, Antiserum gegen verschiedene O - Typen, Behringwerke AG, Marburg-Lahn

Menschliches anti -  $\gamma$  - Globulin vom Kaninchen

### Film

Kodak, Ektachrome DIN 27

### Glycerin PBS

Glycerin 9 Teile

PBS 1 Teil

## C. METHODISCHE GRUNDLAGEN

### 1. Operationen

Um einen klinischen Bezug zu bekommen, wurde entsprechend des häufigsten Infektionsweges die retrograde Applikationsart gewählt, Lipopolysaccharid vom E. coli S-Typ, dem wichtigsten Erregerkeim (s. Einleitung) verwendet und eine schonende Injektion von Lipopolysaccharid durchgeführt. Eine direkte Einbringung von Lipopolysaccharid in die Niere wurde durchgeführt, damit bei eventuellem negativen Penetrationsverhalten klare Aus-

sagen möglich waren. Um Beziehungen zu den wichtigen Arbeiten über experimentelle Pyelonephritiden herzustellen, erfolgte ebenfalls eine Induktion mit lebenden E. coli - Keimen (Cotran 1963; Cotran et al. 1963; Dutz et al. 1965; Sarre 1966; Aoki et al. 1967; Tuan et al. 1970).

Die Ratte wurde mit Äther narkotisiert, auf einem Operations-tisch fixiert, im Operationsbereich geschoren und mit Spray desinfiziert. Das Tier wurde mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die Durchführung der Operation erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

### 1.1 retrograde Injektion

Mit einem 2 - 3 cm langen Längsschnitt wurde die Bauchdecke im Bereich der Linea alba durchtrennt. Die Mm. recti wurden stumpf längs auseinandergedrängt. Die längliche Blase wurde aus der Tiefe vorsichtig mobilisiert und durch zwei Seidenfäden - einer an der Spitze und einer am Blasenhals - mit Hilfe von Klemmen leicht ausgespannt. Der rechte Ureter mußte freipräpariert werden und mit einer losen Schlinge aus Cat - gut versehen werden. Nun wurde die Blase im Bereich des Trigonum zwischen den beiden Ureteren eröffnet, das rechte Ostium mit der Kapillarsonde (s. Material) aufgesucht und diese ca. 1 cm in den Ureter vorgeschoben. Nach Ligatur mit der Cat - gut - Schlinge um die Sondenspitze (nur ein Knoten) erfolgte die Injektion. Die Sonde wurde wieder entfernt, die Ligatur für 5 min durch Abknicken des Ureters total aufrecht erhalten und anschließend blieb die partielle Ligatur bestehen. Die Blase wurde dicht vernäht (Cat-gut 05) und mit Gewebekleber abgedichtet.

### 1.2 direkte Injektion

Die Ratte wurde auf die linke Seite gelagert. Die Eröffnung erfolgte unter dem rechten Rippenbogen. Mit stumpfen Instrumenten wurde die rechte Niere freigelegt und in eine gut sichtbare Position gebracht. Jetzt erfolgte die Injektion (17er Nadel), wobei die Nadel leicht nach außen bewegt wurde. Mit einem Tupfer wurde die Blutung gestillt. Das Vernähen geschah wie oben.

## 2. Blutentnahme bei Ratten

### 2.1 Während der Operation

Mit einer 17er Nadel wurden aus der V. femoralis 0,5 ml Blut entnommen.

### 2.2 Beim Töten der Tiere (unter Anästhesie)

Jetzt konnte das weniger schonende Verfahren der Herzpunktion angewandt werden (0,5 ml Entnahme), weil das Tier gleich anschließend getötet wurde.

## 3. Entnahme der Nieren

Die Versuchstiere wurden schon zu einem frühen Zeitpunkt (nach ca. 8 Tagen) getötet. In diesem Stadium werden die primär induzierten Nieren-Läsionen noch nicht von sekundären Erscheinungen überlagert (z.B. Nekrosen, Narbenbildung). Eine Eliminierung von zu lokalisierendem Antigen hat - wenn überhaupt - noch nicht in großem Maß stattgefunden.

Das Tier wurde narkotisiert, und nach der Herzpunktion konnte es ganz eingeschláfert werden. Nach Öffnung der Bauchhöhle erfolgte eine genaue Inspektion. Aus der Blase wurde mit einer

sterilen Spritze Urin aspiriert und auf Agarplatten auf Bakterienkeime getestet. Die Nieren wurden entnommen und je eine Hälfte (Medianschnitt) wurde in einem Aceton/Trockeneis Gemisch eingefroren (gelagert bei  $-70^{\circ}\text{C}$ ), und je ein Viertel in Formol und Acrylatfixans konserviert.

#### 4. Serumgewinnung

Das Blut wird 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Zentrifugenbecher abgestellt. Dann wird der Blutkuchen von den Wandungen mit einer sterilen Nadel gelöst, um eine Hämolyse beim Zentrifugieren zu vermeiden. Das geronnene Blut wird mindestens für zwei Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend erfolgt die 1. Zentrifugation bei 2800 U/min/12min, es wird dekantiert und abermals zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wird gewonnen und tiefgefroren.

#### 5. O - Antigen Gewinnung zur Kaninchenimmunisierung (nach Spassov)

Von den Bakterien (*E. coli* O:100, *S. abortus equi*) werden auf Agarplatten Einzelkolonien herangezüchtet. Eine Kolonie wird in 10 ml Boullion für 18 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Hälfte dieser Kultur wird im Wasserbad 1 h gekocht. Wenn sich dort keine Autoagglutination (Flockenbildung) ergibt, können aus der anderen Kulturhälfte 4 Agarplatten mit je 0,1 ml beschickt werden. Diese werden 18 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die Platten werden mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung mittels Wattetupfer abgeschwemmt, anschließend wird drei mal gewaschen (4000 U/min/15min). Die Endaufnahme erfolgt dem Trübungsgrad nach. Der Titer sollte ca.  $10^8 - 10^9$  Zellen/ml betragen. Von dieser Endsuspension werden entsprechende Verdünnungen auf Agarplatten gegeben (Titerbestim-

mung). Die Endsuspension wird dann für 2 h bei 100°C erhitzt, um die Bakterien abzutöten. Dies wird auf Agarplatten kontrolliert. Die Antigensuspension wird entsprechend der obigen Titerbestimmung so verdünnt, daß sie einer Ausgangssuspension von  $10^8$  Zellen/ml entspricht.

#### 6. Immunisierung der Kaninchen

Es ist notwendig O-Antigene zu spritzen, da gereinigtes LPS immunologisch geringere Aktivität besitzt (Fukazawa et al., 1970) und auch nicht in genügender Menge zur Verfügung stand. Den Kaninchen wurde die Antigensuspension (siehe 5.) mit einer 17er Nadel in eine Ohrvene injiziert. Dabei wurde nach folgendem Schema verfahren:

|     |     |     |     |     |     |                      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------|
| 1.  | 5.  | 9.  | 13. | 17. | 25. | 31. Tag              |
| 0,5 | 1,0 | 2,0 | 2,0 | 4,0 | 5,0 | totale Blutentnahme  |
|     |     |     |     |     |     | ml Antigensuspension |

Vor der Blutentnahme wurde der Antikörpertiter kontrolliert (Bestimmung nach Widal, Hämagglutinationsverfahren).

#### 7. Totale Blutentnahme beim Kaninchen

Die Kaninchen erhielten eine Äthernarkose. Die Vena jugularis interna wurde freipräpariert, mit zwei Klemmen erfaßt, durchtrennt und in einen Zentrifugenbecher ausgeblutet.

#### 8. Antikörpertiterbestimmung nach Widal

Von den Antiseren werden je zwei Verdünnungsreihen hergestellt. Der erste Schritt beträgt 1/10 (0,1ml in 0,9ml phys. Kochsalzlsg.), die weiteren 1/1 (0,5ml aus 1/10 Röhrchen in 0,5ml physiol. Koch-

salzls., usw.) bis zur Serumendverdünnung 1/5120. Zur Kontrolle werden vier Gläschen mit 0,5ml physiol. Kochsalzls. hergerichtet. In jedes dieser Gläschen werden 0,5ml der Antigensuspension gegeben (noch einmal Verdünnung 1/1), die zur Immunisierung verwendet wurden (siehe 5.). Die Auswertung geschieht nach einer Inkubationszeit von 20h/37°C im Agglutinoskop. Beim Aufschütteln der Gläschen sieht man vom Boden aufwirbelnde zuerst zusammenhängende Flocken. Als Titer gilt die Grenzkonzentration, bei der gerade noch eine Ausflockung wahrnehmbar ist (Vergleiche mit den Kontrollen).

#### 9. Antikörpertiterbestimmung nach der Hämagglutinationsmethode

Die Antikörpertiterbestimmung erfolgte routinemäßig im Bakteriologischen Labor nach dem indirekten Hämagglutinationstest nach Neter et al. (1956) (modifiziert).

#### 10. Kaninchenserumfraktionierung

##### 10.1 Ammoniumsulfatfällung

Das Antiserum wird mit der gleichen Menge PBS im Verhältnis 1/1 verdünnt und in einem eisgekühlten Becherglas auf dem Magnetrührer langsam gerührt. Die gleiche Menge einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung wird in einen Schütteltrichter gegeben und langsam und gleichmäßig in das Becherglas eingetropft. Das sich bildende weißliche Proteinpräzipitat wird noch eine halbe Stunde unter Eiskühlung vorsichtig gerührt. Ergebnis: 50%ige Sättigungsfällung von Globulinen und Spuren von Albuminen. Das Präzipitat wird 30min bei 3000 U/min in der Kälte zentrifugiert. Der rotliche Überstand (Hämoglobinfärbung) wird verworfen. Das

Zentrifugat wird mit PBS (Zugabe tropfenweise) unter gleichmäßigem, vorsichtigem Rühren mit einem Glasstab in Lösung gebracht (Überschreiten des Isoelektrischen Punktes, dazu ca.  $1/3 - 1/2$  Volumen PBS der Ausgangsmenge). Dieser Vorgang der 50%igen Sättigungsfällung wird so oft wiederholt - wobei das letzte Volumen als neue Ausgangsmenge gilt - bis der Überstand nicht mehr rötlich gefärbt ist.

### 10.2 Dialyse zum Austausch der $\text{NH}_4^+$ und $\text{SO}_4^{--}$ Ionen

In einem eingeweichten Dialysierschlauch wird das letzte Volumen von 10.1 gefüllt und in PBS (vorher mindestens 24h in den Kälteraum stellen) auf einem Magnetrührer in der Kälte dialysiert. Dabei gilt: Außenvolumen 100 mal so groß wie Innenvolumen. Die Außenflüssigkeit muß 3x gewechselt werden. Die Minstdialysierzeit beträgt 24h. Es ist jedoch besser diese Zeit zu überschreiten. Danach erfolgt Pufferwechsel auf 0,01 m Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 (weiterer Proteinausfall). Wechsel und Zeit sollten wie beim PBS gehandhabt werden. Die dialysierte Proteidlösung ( $\gamma$ -Globulinrohfraktion im Puffermilieu) wird zentrifugiert (30min/4000 U/min), um weitere ausgefallene Proteine zu eliminieren.

### 10.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose zur Ig-G Gewinnung

DEAE-Zellulose wird nach Vorschrift behandelt und gegen den Startpuffer 0,01m Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert. Hieraus wird eine 40 cm Säule gepackt (Packungshöhe 2m, über Nacht, luftblasenfrei). Die Säule wird mit dem Elutionspuffer über eine Pumpe und ein Spektrometer beschickt (mindestens 1/2h). Ein Schrei-

ber in Verbindung mit einem Fraktionssammler vervollständigt den Aufbau. Das gesamte System wird gekühlt. Die Globulinfraktion aus 10.2 wird dann auf die Säule aufgetragen und vermittle des obigen Puffers eluiert. Aus der Zuordnung des Peaks auf der Registrierung (Schaubild 6) zu den verschiedenen Fraktionen im Sammler ergibt sich das Ig-G des Antiserums. Diese Proteinlösung wird gegen PBS (+Merthiolat) durch Unterdruckdialyse höher konzentriert.

## 11. Markierung der Ig-G Fraktion mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Dialysemethode

### 11.1 Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung

Die Konzentration der Endproteinlösung aus 10.3 wird mit Hilfe der Biuretreaktion bestimmt. Es werden 0,95 ml aqua dest. in Probe und Leerwert gegeben. Der Leerwert wird mit 0,05 ml FBS und die Probe mit 0,05 ml Serum aufgefüllt. Beide werden mit 1,0 ml Biuretreagenz versetzt. Die Proben werden geschüttelt und 1/2h bei Zimmertemperatur belassen. Am Photometer wird bei 540 nm (d=1cm) die Extinktion bestimmt. Aus der Eichkurve ergibt sich die Konzentration in mg%.

### 11.2 FITC Markierungsdialyse des Ig-G

Es wird mit 0,025M Carbonat-Bi-Carbonat-Puffer eine 1mg%ige Proteinlösung hergestellt. Diese Lösung wird gekühlt in einen Dialysierschlauch gefüllt und gegen 10 mal so viel Volumen des obigen Puffers, der 0,2 mg/ml FITC gelöst enthält, dialysiert (16h in der Kälte gerührt). Anschließend wird zentrifugiert 4000U/min/30min.

### 11.3 Abtrennung des nicht gebundenen FITC (Gel-Filtration)

Nach Vorschrift wird ein Sephadex G 25 coarse Gel in 0,14M NaCl, 0,01M K-Phosphatpuffer pH 7,3 aufgequollen. Aus diesem Material wird eine kleine Säule gegossen. Nach Sedimentation wird die Säule gekühlt aufbewahrt. Nun erfolgt vorsichtig der Auftrag der nicht konjugiertes FITC enthaltenden Proteinlösung. Eluiert wird mit dem oben angegebenen Quellpuffer. Nach ca. 1h ist das markierte Ig-G durchgelaufen und von dem zurückbleibenden FITC abgetrennt. Die Ig-G Fraktion läßt sich an Hand der Farbe gut erkennen und ohne Verdünnung auffangen. Eventuell muß anschließend noch eingengt werden.

### 11.4 Fraktionierung des markierten Ig-G in verschiedene Konjugationsgrade

Unter Konjugationsgrad versteht man das Verhältnis FITC Moleküle/Proteinmolekül. Diese Unterschiede lassen sich heranziehen, das markierte Ig-G in einem weiteren Schritt aufzutrennen. DEAE - Sephadex A 50 Gel wird nach Vorschrift aufgequollen, und  $\text{Cl}^-$  Ionen gegen  $\text{PO}_4^{3-}$  ausgetauscht. Danach wird gegen den Startpuffer (0,14M NaCl, 0,01M Phosphatpuffer pH 7,3) äquilibriert. Aus diesem Material wird eine 40 cm Säule gegossen (Packungshöhe 40 cm). Der Geräteanschluß und Auftrag des markierten Ig-G erfolgt wie bei 10.3. Die Elution geschieht zuerst mit 0,14M NaCl, 0,01M K-Phosphat pH 7,3. Es ergibt sich eine Fraktion mit untermarkiertem Ig-G. Durch Änderung der NaCl Konzentration lassen sich verschiedene Konjugationsgrade eluieren. Sinnvoll sind noch 0,2M NaCl etc. und 0,5M NaCl etc. (Schaubild 7). Die gepoolten Fraktionen werden stark eingengt und in der Kälte aufbewahrt.

Die Methoden 10. und 11. wurden nach R.E. Pedmon et al. (1965) - modifiziert von G. Thoeness - durchgeführt. Allgemeine Vorschriften wurden dem Sephadexleitfaden der Fa. Pharmacia Fine Chemical und den verschiedenen Geräteanleitungen entnommen.

## 12. Immunfluoreszenzhistologie

### 12.1 Herstellung der Gefrierschnitte

Die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagerten Nierenhälften werden 24h vor dem Schneiden auf die Temperatur des Schneidegerätes (Cryo-cut Microtome, American Optical Corp.) gebracht ( $16^{\circ}\text{C}$ ). Es werden Gefrierschnitte von  $4\mu$  Dicke hergestellt, und zwar so, daß die gesamte Nierenfläche sagittal erfaßt ist. Die Schnitte werden auf einen Objektträger aufgezogen und ca. 16h bei Raumtemperatur getrocknet und dann mit einem Diamantstift kreisförmig umschrieben.

### 12.2 Immunfluoreszenzfärbung (nach Pielsticker)

Die aufgetrockneten Gefrierschnitte werden in PBS 2x 10min gewaschen, dann für 30 sec. in Aceton von  $4^{\circ}\text{C}$  fixiert und noch einmal für 5 min auf dem Magnetrührer gewaschen. Anschließend werden die Objektträger bis zum Diamantstrich gesäubert, und überschüssiges PBS von den Schnitten, die aber feucht bleiben, entfernt. In einer feuchten Kammer wird dann das Gewebe mit 1 - 2 Tropfen markiertem Ig-G entsprechender Verdünnung überschichtet (innerhalb des Diamantkerbringens ist dies gut möglich) und für 30 min inkubiert. Darauf erfolgt dreimaliges Waschen mit PBS und Eindecken mit Glycerin - PBS. Die Versiegelung mit einem klaren Nagellack hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen.

### 13. Hämalaun (nach Mayer) - Eosin Färbung

Es wurden Gefrier- und Paraffinschnitte gefärbt. Die letzteren erfuhren routinemäßige Behandlung in einem histologischen Labor. Die Gefrierschnitte werden 5 min in 10%igem Formalin fixiert, 10 min gewässert, 15 min in Hämalaun gefärbt, 15 min gewässert, 1 min mit Eosin behandelt, gespült, in der Alkoholreihe entwässert und anschließend eingedeckt.

### 14. LPS Adsorption an Erythrocyten (nach Meier, verändert)

Erythrocyten der Blutgruppe O, Rh werden mit PBS 3x gewaschen (3000 U/min 3min). Drei ml dieser Suspension werden mit 3ml LPS - Lösung (Konzentration 1mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wird ein gleicher Ansatz mit PBS durchgeführt. Nach der Inkubation wird wieder 3x gewaschen. Aus dieser Suspension werden Ausstriche auf entfettete Objektträger hergestellt und 24h getrocknet. Mit diesen Präparaten wird die Immunfluoreszenzfärbung nach 12.2 leicht modifiziert durchgeführt.

## D. ERGEBNISSE der VERSUCHSMETHODIK

### I. TIEREXPERIMENTE

#### 1. Injektion von Endotoxin (LPS), lebenden Bakterien oder physiologischer Kochsalzlösung bei Ratten

Weibliche Wistaratten (ca. 300 g) wurden operiert und Lipopolysaccharidgaben unterschiedlicher Konzentration und Herkunft ausgesetzt. Zur Kontrolle wurden mehrere Tiere nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. 15 Tiere sind aus unterschiedlichen Gründen gestorben. Eine Übersicht über die Versuche gibt die

folgende Tabelle.

Übersicht 1:

Injektionslösg. Konzentration Injektionsart Anzahl der Ratten  
od. Suspension

| A                              | B                         | C         | D  |
|--------------------------------|---------------------------|-----------|----|
| E.c.O:100 LPS                  | 0,1 mg/ml                 | retrograd | 13 |
|                                | 1,0 mg/ml                 | retrograd | 6  |
|                                | 0,1 mg/ml                 | direkt    | 5  |
|                                | 1,0 mg/ml                 | direkt    | 5  |
| S.a.e. LPS                     | 0,1 mg/ml                 | retrograd | 10 |
|                                | 1,0 mg/ml                 | retrograd | 5  |
|                                | 0,1 mg/ml                 | direkt    | 6  |
|                                | 1,0 mg/ml                 | direkt    | 6  |
| E.c.O:100<br>lebende Bakterien | 10 <sup>8</sup> Zellen/ml | retrograd | 5  |
| NaCl-Lösung                    | 0,9 %ig                   | retrograd | 6  |
|                                |                           | direkt    | 3  |

Je Konzentration und Injektionsart wurden mindestens 5 Tiere behandelt. Zum Vergleich erfolgte bei 5 Tieren eine Injektion mit lebenden E. coli O:100. Kontrolltiere wurden mit physiologischer Kochsalzlösung retrograd und direkt behandelt. Schwierigkeiten bei den Operationen ergaben sich vor allem bei der Sondierung des Ureterostiums mit der Kapillare. Wenn diese zu dick oder an der Spitze <sup>nicht</sup> rund geschmolzen war, waren Verletzungen unvermeidlich, und das betreffende Tier konnte nicht weiter verwendet werden. Bei der direkten Injektion wurde versucht, eine starke Blutung der Niere zu vermeiden.

Die Injektion mit der Spezialsonde hat einige Vorteile gegenüber herkömmlichen. Die Kapillaren können leicht selbst herge-

stellt werden und zwar in soviell\*verschiedenen Größen, daß für jedes Tier eine angepaßt werden kann. Für ein verletzungsfreies Sondieren ist Dies sehr wichtig. Der Luftpuffer bewirkt eine schonende Injektion. Außerdem ermöglicht die Kompression des Luftpuffers als Indikator vergleichbare Injektionen. Bei den Experimenten wurde soviel Volumen injiziert, bis sich die Flüssigkeitsgrenze um ca. 0,3 - 0,5 mm verschoben hatte (siehe Zeichnung Material). Für jedes Tier ergibt sich damit eine vergleichbare Füllung des unterschiedlich großen Lumens von Becken und Ureter. Das injizierte Volumen schwankt von 0,1 - 0,3 ml (durchschnittlich 0,15 ml). Als maximale Füllungs menge (Flüssigkeitsaustritt am Hilus) konnte in Vorversuchen ein Volumen von ca. 0,4 ml ermittelt werden. Dies wurde an Nieren bestimmt, die mit dem gesamten Ureter herauspräpariert wurden.

## 2. Rattenexperimente (Tabelle 1-3)

Die Tiere wurden in der Regel nach 6 - 9 Tagen getötet (Spalte G, siehe Methoden 3.). Bei den vorzeitig Getöteten (18%) lag ein schlechter Allgemeinzustand vor.(Entzündungen, Urinaustritt in die Bauchhöhle). Fünf mit lebenden Bakterien behandelte Ratten besaßen starke Nierenabszesse. 13% der Tiere zeigten operationsbedingt insterilen Urin.(Spalte H). Die Tiere 76 - 80 (E.c. lebend injiziert) wurden nicht berücksichtigt. Bei 22 % der rechten Nieren mit partieller Ureterligatur ergab sich ein leichter bis schwerer Urinstau (Spalte Q). In diesen Fällen ist die partielle Ligatur um den Ureter, die ohne Gegenknoten gelegt wurde, nicht aufgegangen, und der Durchgang wurde verstopft. In einigen anderen Fällen traten Entleerungsstörungen an der Blase auf. Um die

Auswirkungen festzustellen, wurden zur Kontrolle zwei Tiere (Tabelle 3) nur mit solchen Ligaturen versehen und später ebenfalls histologisch untersucht.

### 3. Titer der Antikörperseren bei Kaninchen durch Injektion von bakteriellem O-Antigen

Je zwei Kaninchen (ca. 2,5 - 3,0 kg) erhielten Injektionen steigender Dosen O-Antigene (E.c.O:100, S.a.e.) über einen längeren Zeitraum (Methoden 6.). Vor der letzten Applikation wurde eine Serum-Antikörpertiterbestimmung nach Widal (Methoden 8.) und nach dem Hämagglutinationsverfahren (Methoden 9.) durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Übersicht 2. dargestellt.

#### Übersicht 2:

Serumantikörpertiterbestimmung bei Kaninchen

| O - Antigen | Serumantikörpertiter |          |                          |         |
|-------------|----------------------|----------|--------------------------|---------|
|             | nach Widal           |          | Hämagglutination (Neter) |         |
|             | 1. Tier              | 2. Tier  | 1. Tier                  | 2. Tier |
|             | A                    | B        | C                        | D       |
| E.c.O:100   | 1/2560               | 1/2560   | 1/5120                   | 1/5120  |
| S.a.e.      | 1/2560               | > 1/1280 | 1/5120                   | 1/5120  |

Die Tiere wurden bis zur totalen Blutentnahme über 31 Tage immunisiert. Dieser relativ lange Zeitraum ist notwendig, um von dem später gebildeten Ig-G Antikörpern genügend hohe Konzentrationen zu erreichen (Fukazawa et al., 1970; Holmgren et al., 1972), da für die Immunfluoreszenzmikroskopie nur diese Fraktion mar-

kiert wurde.

Von den mit E.c.O:100 Antigen immunisierten Kaninchen ergaben sich 140 ml Antiserum, von denen mit S. abortus equi 130 ml (Methoden 7. und 4.).

#### 4. Immunologische Situation der Ratten

Aus den histologischen Ergebnissen (Abschnitt E.) hat sich eine Reaktion von Zellen des Immunsystems auf die Lipopolysaccharide ergeben. Da mehrere Autoren auch für die Pathologie der Pyelonephritis eine Immunkomponente annehmen (Sanford et al., 1962, 1965; Arana et al., 1965; Shirai et al., 1965; Sarre, 1966; Schäfer, 1966; Aoki et al., 1969; Kass, 1969; Neter, 1972), untersuchten wir bei einigen Ratten Seren, die während der Operation und der Nierenentnahme gewonnen wurden (Methoden 2), auf Antikörpertiter gegen das verwendete LPS (Methoden 9). Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 1 - 3, Spalte I wiedergegeben. In Schaubild 5 ist das Ergebnis graphisch dargestellt.

Es zeigt sich, daß jedes Tier individuell auf die LPS Injektion reagiert. Der Ausgangstiter ist für E.coli Antigen hoch und unregelmäßig, für S. abortus equi Antigen bis auf eine Ausnahme für alle Tiere Null. Generell erhöht jede LPS Injektion den Titer - nur drei Tiere reagierten nicht. In einigen Fällen war die Reaktion sehr stark. Die durchschnittliche Titerstufenänderung ist für S. abortus equi LPS mit 3,0 am stärksten (auf niedrigem Niveau), bei E.coli LPS liegt sie mit 2,4 knapp darunter; allerdings findet die Stimulation auf höherer Stufe statt. Die Analyse der Einzelsituation der Tiere (Tabelle 1-3) und der Abhängig-

keit zwischen Konzentration und Injektionsart lassen keine signifikanten Zusammenhänge zur Antikörpertiterveränderung erkennen.

Bei der Injektion lebender Coli Bakterien korrelieren die beiden Kurven stark - in einem Fall tritt wahrscheinlich durch Antikörper Verbrauch eine Verminderung der Antikörperkonzentration auf.

## II. Das IMMUNFLUORESZENZSERUM ( Ig-G Fraktion)

Die Immunfluoreszenzhistologie wird nach der direkten Methode durchgeführt, d.h.: das Fluoreszein wird an die spezifischen Antikörpermoleküle gebunden (Coons, 1941; 1942).

### 1. Serumfraktionierung

Durch die Ammoniumsulfatfällung (Methoden 10.1) werden alle Globuline aus dem Rohserum ausgefällt. Hämoglobin und Albumin bleibt im Überstand zurück. Wenn das Ausgangsserum stark hämolytisch war, reicht eine einmalige Ausfällung nicht aus. Die hier verwendeten Seren wurden 3x behandelt. Der Dialyse (Methoden 10.2) folgt die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (Methoden 10.3). Zweck dieser Prozedur ist es, die Serumproteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladungen zu trennen. Bei dem hier benutzten Puffer wird nur die Ig-G Fraktion eluiert, alle anderen Proteine bleiben auf der Säule zurück und können verworfen werden. Schaubild 6 zeigt einen resultierenden Peak. Bei 35 Fraktionen a 10ml ergibt sich ein so großes Volumen, das in der Vakuumdialyse zu ca. 10ml nur Ig-G enthaltende Proteinlösung eingeengt wird (Konzentration ca. 6%ig). Beim S.a.e. Antiserum war

nur ein Durchgang notwendig, das D.c.O:100 Serum mußte geteilt werden, da die DEAE-Säule eine beschränkte Kapazität besitzt.

## 2. Fluoreszenzmarkierung der Ig-G Fraktion

Die Proteinlösung wird auf eine Konzentration von 1% eingestellt (Methoden 11.1). Die Konjugation von Ig-G Protein und FITC erfolgt wie beschrieben (Methoden 11.2). Da die Konjugation mit einem Überschuß an Fluoreszein erfolgt, muß das nicht gebundene wieder abgetrennt werden. Dies geschieht durch Ultrafiltration an Sephadex G 25 (Methoden 11.3). Dabei bleiben die kleineren FITC Moleküle stark hinter den großen des Ig-G zurück. Beide Banden sind gefärbt, und man kann die Trennung deshalb sehr gut verfolgen und die entsprechenden Eluate gewinnen.

Die sich so ergebende markierte Proteinlösung enthält Ig-G Moleküle unterschiedlicher Konjugationsgrade (FITC Moleküle/Ig-G Molekül). Diese Lösung ist schon zur Immunhistologie zu verwenden. Beim Austesten zeigte sich aber noch eine starke unspezifische Hintergrundfluoreszenz, die auf die übermarkierten Proteinanteile zurückzuführen ist. Die Neigung zur Unspezifität nimmt mit dem höheren Konjugationsgrad zu.

Die Ig-G Lösung läßt sich auf Grund der unterschiedlichen Konjugation an einer DEAE - Sephadex Säule mit PBS verschiedener NaCl Konzentration weiter fraktionieren. Schaubild 7 zeigt als Beispiel einen Lauf für markiertes E. coli Ig-G, der erste Peak wurde bei 0,14m NaCl Gehalt eluiert. Er repräsentiert die am schwächsten markierte Ig-G Fraktion. Mit 0,2m NaCl erhält man eine Fraktion mit mittlerem und bei 0,5m NaCl eine mit starkem

Konjugationsgrad. Ein weiteres Erhöhen der Konzentration führt zu den nicht brauchbaren hochkonjugierten Ig-G Fraktionen. Die Proben 1 und 2 wurden gesammelt und ausgetestet, die Fraktion 3 diente als Reserveserum und wurde nicht verwendet.

### 3. Kontrollen zu Spezifität der Ig-G Seren

#### 3.1 Ig-G Immunfluoreszenzseren ausgetestet gegen E.c.O:100 und S.a.e. Antigen

Bakterien- und O-Antigensuspensionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der markierten Seren versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Aus diesen Suspensionen hergestellte Präparate zeigten unter dem Immunfluoreszenzmikroskop folgendes Ergebnis.

#### Übersicht 3:

| markiertes Ig-G<br>versch. Konz. | S u s p e n s i o n e n v o n |                 |                         |                 |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|                                  | E. coli O : 100               |                 | Salmonella abortus equi |                 |
|                                  | lebend                        | O-Antigen       | lebend                  | O-Antigen       |
|                                  | A                             | B               | C                       | D               |
| <hr/>                            |                               |                 |                         |                 |
| E.c.O:100                        |                               |                 |                         |                 |
| 1/5                              | 4+                            | 4+ <sup>x</sup> | 0                       | 0               |
| 1/10                             | 4+                            | 4+ <sup>x</sup> | 0                       | 0               |
| 1/15                             | 4+                            | 4+ <sup>x</sup> | 0                       | 0               |
| <hr/>                            |                               |                 |                         |                 |
| S.a.e.                           |                               |                 |                         |                 |
| 1/5                              | 1+                            | 0               | 4+                      | 4+ <sup>x</sup> |
| 1/10                             | 1+                            | 0               | 4+                      | 4+ <sup>x</sup> |
| 1/15                             | 0                             | 0               | 4+                      | 4+ <sup>x</sup> |
| <hr/>                            |                               |                 |                         |                 |

Bewertungsskala: 0 = keine Fluoreszenz, 1+ = sehr schwache Fl.,  
2+ = schwache Fl., 3+ = mittlere Fl., 4+ =  
starke Fl., x = Fl. trat in amorphen Haufen auf.

Die markierten Seren zeigen mit dem homologen Antigen eindeutig spezifische Reaktion. In den Präparaten mit lebenden Bakterien war deren Form sehr gut zu erkennen, während in Seren mit O-Antigen amorphe fluoreszierende Klumpen festgestellt wurden. Die Kreuzreaktion mit dem jeweils heterologen Antigen zeigte keine Fluoreszenz bis auf zwei schwache Werte (Spalte A). Diese geringe Fluoreszenz ist wohl der Ausdruck eines *E. coli* Antikörpertiters im *S. abortus equi* Antiserum. Bekanntlich besitzen die Tiere in der Regel alle einen *E. coli* Antikörpertiter, während Salmonellen Antikörper selten auftreten (vergleiche auch Schaubild 5 und Kapitel D. I. 4.).

### 3.2 Ig-G Immunfluoreszenzseren ausgetestet gegen LPS beladene Erythrocyten

Um Aussagen über die Spezifität der Seren gegenüber dem entsprechenden Lipopolysaccharid zu erhalten, das als Endotoxin den Ratten injiziert wurde, erfolgte eine Beladung von Erythrocyten mit LPS (Methoden 14). In der Immunfluoreszenzmikroskopie ergab sich folgendes Bild.

#### Übersicht 4:

| markiertes Ig-G<br>versch. Konz. | E r y t h r o c y t e n |                     |   |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------|---|
|                                  | mit E.c.O:100 LPS       | S.a.e. LPS ohne LPS |   |
|                                  | A                       | B                   | C |
| E.c.O:100                        |                         |                     |   |
| 1/5                              | +                       | -                   | - |
| 1/10                             | +                       |                     |   |
| 1/20                             | +                       |                     | - |
| 1/40                             | +                       | -                   |   |
| S.a.e.                           |                         |                     |   |
| 1/5                              | -                       | +                   | - |
| 1/10                             |                         | +                   |   |
| 1/20                             |                         | +                   | - |
| 1/40                             | -                       | +                   |   |

Zeichenerklärung: + = Fluoreszenz an der Erythrocytenoberfläche  
- = keine Fluoreszenz

Auch hier ist die Spezifität der Immunfluoreszenzfärbung mit dem homologen LPS gegenüber dem heterologen ganz eindeutig. Die Kontrollerythrocyten ohne LPS reagierten negativ. Die Seren zeigen bis zur Verdünnung 1/40 noch schwache Fluoreszenzaktivität.

### 5.3 Ig-G Immunfluoreszenzseren ausgetestet gegen Antigenpositive Nierenschnitte

Einer anästhesierten Ratte wurde mit einer Klemme der Blutkreislauf zu beiden Nieren unterbrochen. Mit einer Spritze erfolgte dann in eine Niere die Injektion lebender Bakterien von *E. coli* O:100 oder *S. abortus equi*. Dabei wird von der Einstichstelle die Nadel fächerförmig in die gesamte Niere gestochen und gleichzeitig injiziert, um die Bakterien über die gesamte Niere zu verteilen. Bei der Gegenniere wird die gleiche Prozedur mit entsprechendem LPS wiederholt. Anschließend werden die Nieren für kurze Zeit wieder an den Kreislauf angeschlossen, die Ratten anschließend getötet und die Nieren entnommen. Nach Methoden 12. werden Immunfluoreszenzpräparate hergestellt und mikroskopisch ausgewertet.

Übersicht 5:

| markiertes Ig-G<br>versch. Konz. | H i s t o l o g i s c h e   P r ä p a r a t e |     |                           |     |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|-----|---------------------------|-----|
|                                  | <u>mit E.c.O:100 Antigen</u>                  |     | <u>mit S.a.e. Antigen</u> |     |
|                                  | Bakterien                                     | LPS | Bakterien                 | LPS |
|                                  | A                                             | B   | C                         | D   |
| <hr/>                            |                                               |     |                           |     |
| E.c.O:100                        |                                               |     |                           |     |
| 1/1                              | 4+                                            | 4+  | -                         | -   |
| 1/2,5                            | 4+                                            | 4+  | -                         | -   |
| 1/5                              | 4+                                            | 4+  | -                         | -   |
| 1/7,5                            | 4+                                            | 3+  | -                         | -   |
| 1/10                             | 3+                                            | 3+  | -                         | -   |
| 1/15                             | 3+                                            | 3+  | -                         | -   |
| 1/20                             | 3+                                            | 3+  | -                         | -   |
| 1/25                             | 2+                                            | 2+  | -                         | -   |
| 1/30                             | 2+                                            | 2+  | -                         | -   |
| <hr/>                            |                                               |     |                           |     |
| S.a.e.                           |                                               |     |                           |     |
| 1/1                              | -                                             | -   | 4+                        | 4+  |
| 1/2,5                            | -                                             | -   | 4+                        | -   |
| 1/5                              | -                                             | -   | 4+                        | 4+  |
| 1/7,5                            | -                                             | -   | 4+                        | 4+  |
| 1/10                             | -                                             | -   | 3+                        | 3+  |
| 1/15                             | -                                             | -   | 3+                        | 3+  |
| 1/20                             | -                                             | -   | 2+                        | 2+  |
| 1/25                             | -                                             | -   | 2+                        | -   |
| 1/30                             | -                                             | -   | 2+                        | 2+  |

Bewertungsskala: 1+ = sehr schwache spez. Fluoreszenz, 2+ =  
schwache spez. Fl., 3+ = mittlere spez. Fl.,  
4+ = starke spez. Fl., - = keine spez. Fl.

Bei der Antiserumbehandlung der Präparate mit dem homologen Antigen ist jeweils starke bis mittlere spezifische Fluoreszenz bei E.c.O:100 bis zur Verdünnung 1/20, bei S.abortus equi bis zur Verdünnung 1/15 nachweisbar. Die Spezifität ergibt die Kreuzre-

aktion. In keinem Fall konnte bei den heterologen Antigenen spezifische Fluoreszenz festgestellt werden.

Neben der Spezifitätskontrolle wurden in diesen Experimenten auch die Bestimmungen der für die Immunhistologie notwendigen Antiserumkonzentrationen vorgenommen. Dazu wurde beurteilt: Spezifische Fl., Hintergrundfluoreszenz (Unspezifität), Kontrast, Ausbleichzeit. Für eine gute Augendiagnostik wurde für E.c.O:100 Antiserum die Verdünnung 1/20, für S. abortus equi 1/15 bestimmt. Möglich war die Augendiagnose jeweils auch noch bis zur Verdünnung 1/30. Bei der Beurteilung für die Fotografie mußte aber die Ausbleichung berücksichtigt werden, die unterhalb der 1/10 Verdünnung sehr rasch erfolgte. Für die Immunhistologie wurde deshalb die Serumverdünnung 1/10 bestimmt.

#### 3.4 Spezifität der Antiseren, die sich aus den Kontrollen zur Immunhistologie ergibt

Die immunhistologischen Präparate wurden in Kreuzversuchen mit heterologen Antiseren kontrolliert. E. coli anti OK und anti-J-Globulin sind industrielle Seren (siehe Material). Die Resultate bei einigen Tieren gibt die Übersicht 6 wieder.

Die Daten der Ratten ergeben sich aus Tabelle 1 - 3. Die Zahlen in der Übersicht sind aus den Präparaten der Immunfluoreszenz ermittelt worden (Tabelle 1 - 3, Spalte K und L, 2. Zahl; siehe auch Kapitel E. I.1).

Übersicht 6:

| Ratte     | Immunfluoreszenzantiserum |       |           |       |                |                |                 |       |
|-----------|---------------------------|-------|-----------|-------|----------------|----------------|-----------------|-------|
|           | homolog                   |       | heterolog |       | E.c.anti-OK    |                | anti-f-Globulin |       |
|           | re.N.                     | li.N. | re.N.     | li.N. | re.N.          | li.N.          | re.N.           | li.N. |
|           | A                         | B     | C         | D     | E              | F              | G               | H     |
| 35        | 64                        | 0     | 2         | 0     | O <sup>x</sup> | O <sup>x</sup> | 0               | 0     |
| 48        | 43                        | 2     | 2         | 0     | O <sup>x</sup> | O <sup>x</sup> | 0               | 0     |
| 63        | 35                        | 1     | 4         | 0     | O <sup>x</sup> | O <sup>x</sup> | 0               | 0     |
| 79        | 1000                      | 8     | 0         | 0     | O <sup>x</sup> | O <sup>x</sup> | 0               | 0     |
| Kontrolle |                           |       |           |       |                |                |                 |       |
| 85        | 0                         | 0     | 0         | 0     | O <sup>x</sup> | O <sup>x</sup> | 0               | 0     |

Zeichenerklärung: x = starke Hintergrundfärbung, teilweise membranartiger Struktur

Den Aspekt der Spezifität der Antiseren geben vor allem die Spalten A und C im Vergleich wieder. Mit dem homologen Serum ergibt sich eine starke Fluoreszenzaktivität, die bei der Behandlung des gleichen Nierengewebes mit dem heterologen Serum nicht mehr vorhanden ist. Auch die Behandlung der Gewebe mit den Fremdseren (Spalte E und G) ergeben keine Fluoreszenzen, die mit den spezifischen (Spalte A) verwechselt werden könnten.

E. HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE

I. Immunhistologie

Nach Methoden 12.1 werden von jeder Rattenniere drei Gefrierschnitte hergestellt. Im Anschluß an den ersten Schnitt werden ca. 60  $\mu$  verworfen und dann erst der Zweite gewonnen, um Gewebe aus verschiedenen Bereichen der Niere zu erhalten. Der an den zweiten direkt anschließende Gefrierschnitt wurde einer

Hämalaun - Eosin - Färbung unterzogen (Methoden 13). Somit ist ein Parallelpräparat für die Lichtmikroskopie in ca. 4  $\mu$  Entfernung vorhanden. Wenn in einer Niere keine spezifische Fluoreszenz nachweisbar war, wurde die oben beschriebene Prozedur zur Ergebnisabsicherung noch einmal wiederholt. Die Immunfluoreszenzfärbung der Präparate ist in Methoden 12.2 beschrieben. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden die Schnitte stichprobenartig mit dem jeweils heterologen markierten Antiserum geprüft. Außerdem wurden zwei industrielle Seren verwendet. Die Ergebnisse entsprachen denen in Kapitel D. II. 3.4. Nie wurden Werte gefunden, die sich signifikant von denen der Kontrollnieren unterschieden hätten.

#### 1. Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse

Die Immunfluoreszenzpräparate wurden unter dem UV-Mikroskop systematisch abgefahren und die Zentren spezifischer Fluoreszenz registriert. Als Zentrum wurde bezeichnet:

Ein Bereich (umschriebener) spezifischer Fluoreszenz im interstitiellen und epithelialen Gewebe von Nierenmark, -rinde oder -papille. Daneben ließen sich Anhäufungen von Fluoreszenzen in den Hohlräumen von Blutgefäßen oder des Nierenbeckens feststellen. Interstitiell prägt sich die Fluoreszenz ebenfalls umschrieben, aber diffus und unstrukturiert aus. Wenn sie zellgebunden ist (herdförmig in Epithelien, Phagozyten, Rundzellen), stellen sich die Zellkerne als dunkle Bereiche in einem Zytoplasma dar, das granulär bis vollkommen homogen angefärbt ist (siehe Fotos). Einzelne, verstreute, spezifisch fluoreszierende Zellen wurden nicht gezählt.

Die Anzahl solcher Zentren auf den Immunfluoreszenzpräparaten (alle Werte werden auf zwei Präparate bezogen) gibt in Tabelle 1 - 3, Spalte K und L die erste Zahl wieder. Graphisch werden diese Ergebnisse in den Schaubildern 1 - 3 (weiße Säulen) dargestellt.

Neben diesem Nachweis von LPS in allen Bereichen der Niere besteht aber noch die Beziehung: je stärker und ausgedehnter die umschrieben lokalisierte Fluoreszenz, desto mehr Antigen ist in diesem Gewebebereich vorhanden. Um diese Verhältnisse quantitativ auszudrücken, wurden folgende Bewertungskriterien angewendet: Ein Zentrum mit schwacher Fluoreszenz wurde wie oben mit einem Punkt gezählt. Bei mittlerer und starker Fluoreszenz wurde mit zwei und drei Punkten bewertet. Wenn die Ausdehnung der Fluoreszenzzentren sich über einen größeren Bereich als drei Tubuli einschließlich Interstitium erstreckte, wurden die nach der Fluoreszenzstärke ermittelten Punkte mit 2 multipliziert (Flächenbeziehung). Z.B. Ein starkes Fluoreszenzzentrum, das sich über einen Bereich von 5 Tubuli einschließlich Interstitium erstreckt, wurde mit 6 Punkten erfasst. Ein zur Hälfte mit spezifischer Fluoreszenz gefärbtes Präparat ergab einen Wert von fast 500. Die total gefärbten Präparate werden deshalb mit 1000 gezählt.

Die nach diesem Schema erstellten Werte geben einen Anhaltspunkt für den unterschiedlichen Endotoxingehalt der Nieren (Tabelle 1 - 3, Spalte K und L, 2. Zahl; Schaubild 1 - 3, schraffierte Säulen).

## 2. Vergleich der Immunfluoreszenzserumergebnisse an Hand der Schaubilder 1 - 4

Es kommt keine Relationsumkehrung oder stärkere Verschiebung beim Vergleich der weißen (nur ausgezählte Werte, keine Beurteilung der Fluoreszenz, unabhängig von möglichen Unterschieden der Immunfluoreszenzserumaktivitäten) mit den schraffierten Säulen (Werte mit Beurteilung nach der Fluoreszenzaktivität und der flächigen Ausbreitung) vor. Die folgenden Betrachtungen können sich deshalb auf die letzten Ergebnisse beschränken (schraffierte Säulen).

Im Schaubild 1 sind die Versuchsergebnisse der *E. coli* O:100 LPS Injektionen verdeutlicht. Bei der retrograden Injektion ergibt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den 0,1 mg/ml und 1,0 mg/ml LPS-Konzentrationen (Säulen A,C). In den behandelten rechten Nieren ist im zweiten Fall ca. 8x soviel Endotoxin nachweisbar. Bei den linken Nieren ergibt sich für 0,1 mg/ml Konzentration (Säule B) ein Wert, der sich nur geringfügig vom Kontrollwert absetzt. Die höhere Dosis (Säule D) zeigt einen weit größeren Betrag. Es muß Endotoxin von der rechten in die linke Niere gelangt sein. Ob dies hämatogen (zellulär gebunden) oder lymphogen geschieht kann nicht entschieden werden. Nach neueren Ergebnissen über das Lymphsystem in der Niere, darf der lymphogene Übertragungs- oder Infektionsweg auf keinen Fall ausgeschlossen werden (Dieterich, Kriz, 1972; Cockett et al., 1970).

Bei den direkten Injektionen liegen die Werte für die entsprechenden Konzentrationen generell niedriger als bei den retrograden. Eine stärkere Verschiebung zeigt bei der 1,0 mg/ml Kon-

zentration der Vergleich rechte zur linken Niere (Säule G mit H). Die linken Nieren besitzen im Verhältnis einen stärkeren Endotoxinanteil. Vielleicht ergibt sich durch die direkte Injektion eine bessere Übertragungsmöglichkeit (s.o.). Bei allen Tieren läßt sich ein sehr starkes Endotoxingefälle von der rechten zur linken Niere feststellen.

Für die *S. abortus equi* Ergebnisse (Schaubild 2) liegen die Relationen bei retrograder Injektion ähnlich wie oben beschrieben. Ein Unterschied stellt sich aber für die linken Nieren dar, die hier alle auf dem Kontrollniveau liegen, und für die Beträge, die fast durchweg beträchtlich niedriger liegen. Es hat demnach keine Übertragung von rechts nach links stattgefunden.

Der Vergleich der Immunfluoreszenzergebnisse von *E. coli* und *S. abortus equi* behandelten Nieren in Schaubild 4 läßt erkennen, daß durchschnittlich mehr als doppelt soviel *E. coli* 0:100 als *S. abortus equi* Endotoxin nachweisbar war.

Im Schaubild 3 sind die Ergebnisse, die durch die retrograde Injektion von lebenden *E. coli* 0:100 erzielt wurden, dargestellt. Der Endotoxingehalt der rechten Nieren ist ganz erheblich (2600). Auffallend ist hier die unterschiedliche Ansprechbarkeit der Nieren auf die bakteriellen Antigene, die ihren Ausdruck in der großen Schwankungsbreite findet (Einzelergebnisse Tabelle 1, Spalte K). Sehr überraschend erscheint der beträchtliche Gegensatz rechter zur linken Niere (links über 80x geringer), obwohl nach kurzer Zeit schon eine massive Bakteriämie bei den Tieren nachzuweisen ist (Tuan et al., 1970; Daum). Nach Litera-

tum kann sich eine bakterielle Pyelonephritis jedoch nur an, wenn hämatogen eingestreute Bakterien eine Läsion in der Niere vorfinden, oder eine solche bestanden hat (Prat, 1959; Schäfer, 1965; Tuan, 1970). Der Wert der linken Nieren entspricht fast genau dem bei retrograder Injektion mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml (Schaubild 1, Säule D). Auf die Gegenniere könnte nur Antigenes Material (Endotoxin) übertragen worden sein, für dessen Eindringen ins Gewebe die oben geforderte Nierenschädigung dann nicht notwendig wäre.

Zusammenfassend ergibt sich aus der quantitativen Betrachtung der Immunfluoreszenzpräparate:

1. Lipopolysaccharide können aus dem Becken- Ureterlumen in das Nierengewebe penetrieren
2. LPS erscheint in der behandelten Niere viel stärker als in der Gegenniere
3. Die in der Niere nachweisbare Antigenmenge ist konzentrationsabhängig
4. Die retrograde Injektion führt zu besseren Ergebnissen als die direkte.
5. Durchschnittlich ist doppelt soviel E. coli als S. abortus equi LPS nachweisbar bei gleicher Konzentration und Menge.

### 3. Qualitative Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse (siehe auch Fotos)

#### 3.1 E.c. LPS retrograd injiziert (Konzentration 1 mg/ml, rechte Nieren)

In den gesamten Präparaten - oft im Bindegewebe des Hilus des Beckens und des Sinus renalis - konnten immer neben diffusen oder scholligen, amorphen Fluoreszenzbereichen auch spezifisch fluoreszierende, mononukleäre Zellen nachgewiesen werden (oft perivasal). In parallelen Hämalaun-Eosinschnitten befanden sich dort Rundzellinfiltrate (Lymphocyten, Plasmazellen), Granulocyten und auch Histiocyten. Auf Grund der Zellstrukturen und der Vergleiche mit den HE Parallelschnitten, ist es wahrscheinlich, daß auch Rundzellen spezifische Fluoreszenz zeigten. Die Granulocyten können eine unspezifische Färbetendenz in der Immunfluoreszenz aufweisen. Inwieweit diese spezifische (Phagocytose von LPS Antigen) oder unspezifische Fluoreszenz zeigen, kann nicht eindeutig abgegrenzt werden. Da aber mitunter mehr Granulocyten auftraten als Fluoreszenzaktiv waren, dürfte es sich um spezifische Fluoreszenz handeln. Auch in Kontrollnieren aufgetretene Granulocyten zeigten keine Fluoreszenz, die als spezifisch angesehen werden könnte. Die Kreuzversuche mit heterologen Antiseren ließen ebenfalls keine Granulocytenfärbung erkennen (siehe Kapitel D. II. 3.4).

Im Nierengewebe (Rinde, Mark, Papille) konnten herdförmige Infiltrate festgestellt werden. Am häufigsten wurden diffuse und unstrukturierte Fluoreszenzen im interstitiellen Gewebe gefunden. In wenigen Fällen waren Tubulusepithelien und deren Basal-

membranen betroffen. Blutgefäßanteile konnten in keinem Fall mit irgendeiner Fluoreszenz gefunden werden - außer zellulärer spezifischer Fluoreszenz im Lumen. In der Papille trat die Färbung oft als länglicher diffuser Bereich parallel zu den duktus papillares auf.

### 3.2 E. coli LFS retrograd injiziert (Konzentration 0,1 mg/ml, rechte Nieren)

Im Bindegewebe von Hilus, Becken und Sinus renalis (subepithelial) konnten in abgeschwächter Form Beobachtungen wie unter 3.1 beschrieben registriert werden. Dagegen war die Ausbreitung der Fluoreszenz in das eigentliche Nierengewebe gering. Die Immunfluoreszenzwerte in Tabelle 1 - 3 ergaben sich hauptsächlich aus Fluoreszenzen im Bindegewebe der oben beschriebenen Bereiche.

### 3.3 S. abortus equi LFS retrograd injiziert (Konzentration 1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml, rechte Nieren)

Unterschiede zu den oben festgestellten entsprechenden Ergebnissen bestehen in einer viel geringeren Frequenz des Auftretens von spezifischer Fluoreszenz im Nierengewebe. Dort konnten bei der 0,1 mg/ml Konzentration keine spezifischen Färbungen gefunden werden. Die zelluläre Infiltration (Beckenregion), die immunfluoreszenzaktiv erfaßt wurde, war in diesen Fällen ebenfalls geringer.

### 3.4 E. coli O:100 lebende Bakterien, retrograd injiziert, rechte Nieren

Bei einem Großteil der Präparate war eine totale Färbung zu be-

obachten, die teilweise so stark war, daß eine Differenzierung unmöglich wurde. In diesen Fällen waren auch die Blutgefäße mit erfaßt. Bei differenzierbaren Präparaten konnten zusätzlich zu den in 3.1 beschriebenen aber hier viel stärker auftretenden Erscheinungen noch nekrotische Bereiche und Abszesse, die sich in stark scholliger, undifferenzierter Fluoreszenz darstellten, und eine viel stärkere Granulocyteninfiltration festgestellt werden. Es war möglich, einzelne Bakterien zu erkennen (Fluoreszenzwall) - aber nie intrazellulär in Makrophagen oder Epithelzellen.

### 3.5 E. coli und S. abortus equi LPS direkt injiziert, Konzentration 1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml, rechte Nieren

War der Einstichbereich erfaßt - wie in einigen Fällen - so zeigte sich das umgebende Gewebe mit stark scholliger bis diffuser Fluoreszenz. In den übrigen Präparatbereichen war dies nicht der Fall. Hauptsächlich waren zelluläre Infiltrationen im Decken und Ureter umgebenden Bindegewebe zu finden - sowohl im Fluoreszenzpräparat, als auch in parallelen HE Färbungen. Auch hier bestand im Auftreten von Fluoreszenzaktiven Infiltraten Konzentrations und Bakterienspeziesabhängigkeit (E. coli LPS zeigte stärkere Erscheinungen).

### 3.6 Ergebnisse bei den linken Nieren aller Tiere und der Kontrollen

Generell ergab sich für alle linken Nieren und die Nieren der Kontrolltiere, daß in Mark, Rinde und Papille nur ausnahmsweise Farbzentren aufzufinden waren. Bei den linken Nieren der behandelten Tiere fanden sich in geringem Maß Fluoreszenzaktive In-

filtrationen im Bindegewebebereich des Sinus renalis, Feckens und Hilus bei: E. coli O:100 retrograd und direkt injiziert, Konzentration 1,0 mg/ml; E. coli O:100 retrograd injiziert, lebende Keime.

#### 4. Synoptische Beschreibung der quantitativen und qualitativen Ergebnisse in Abschnitt 2. und 3.

Endotoxine von E. coli und S. abortus equi sind in den retrograd behandelten Tieren im gesamten Querschnitt der Niere in unterschiedlichen Mengen nachweisbar, wenn die hohe Konzentration oder lebende Bakterien appliziert wurden. Bei den niedrigen Konzentrationen oder bei den linken Nieren konnte LPS im wesentlichen nur im Becken und Hilus umgebenden Gewebe gefunden werden. Es besteht eine Konzentrationsabhängigkeit für das Auffinden des Endotoxins im Mark- und Rindengewebe.

Bei der direkten Injektion von LPS in die Niere kommt es kaum zur Verbreitung ins Gewebe. Die Abhängigkeit von Antigen und Konzentration manifestiert sich hier in der unterschiedlichen zellulären fluoreszenzaktiven Invasion. S. abortus equi LPS ist gegenüber dem E. coli O:100 LPS in viel geringerem Maß nachweisbar. Die retrograde Injektion erwies sich in Verbindung mit der hohen LPS Konzentration als eine probate Methode, um Endotoxin auf molekularer Basis im Nierengewebe zu verteilen.

#### II. Pathologische Auswertung der Hämalaun-Eosin Präparate

Die aus den Paraffinschnitten hergestellten HE-Präparate (Metho-

den 13) wurden pathohistologisch ausgewertet<sup>x)</sup>. Allgemein liegen sich folgende Befunde erheben:

Extra- und intravasale Zellvermehrung, Rundzellinvasionen (oft perivasal), interstitiell netzig-diffus oder Herdförmig (dann auch mit Plasmazellen), oft follikelartig. Herdförmige, lympho-histiocytäre Infiltrate konnten festgestellt werden. Häufig waren diese Infiltrationen mit Destruktionen verbunden, die Granulocyteninfiltrate zeigten (vor allem an Tubulusepithelien). Nekrotische Bereiche mit Rundzellherden enthielten kleine Lymphocyten und Histiocyten. Granulocyten konnten oft im subepithelialen Bindegewebe des Nierenbeckens gefunden werden. Multiple und konfluierende Abszesse lokalisierten sich in Rinde und Mark (aber nur bei lebenden Bakterien als Antigen). Pigmentierungen, Eiweißablagerungen (Zylinder) und Dilatationen der Tubuli im Sinne einer Hydronephrose oder Nephrohydrose konnten in einigen Präparaten nachgewiesen werden.

Um die Einzelpräparate in ihren unterschiedlichen Ausprägungen zu beschreiben, wurde eine Skala verschiedener infiltrativ, entzündlicher Erscheinungen aufgestellt.

0 = Keine pathologischen Veränderungen in Bezug infiltrativer zellulärer Reaktionen

1+ = geringe intra- und extravasale Zellvermehrung, geringe interstitiell, intertubuläre Rundzellansammlungen

2+ = Deutlichere Erscheinungen wie bei 1+. Daneben geringe granulocytäre Infiltrationen mit nur leichten Destruk-

<sup>x)</sup> Die Beurteilung hat freundlicher Weise Herr Dr. F. Fielsticker, Pathologisches Institut der Universität München, übernommen

tionen

- 3+ = Starke Rundzellvermehrung (herdförmig oder netzig-intertubulär); interstitielle lympho-histiocytäre Infiltrate (ev. follikelartig); Herddestruktionen mit Granulocyteninfiltraten; ev. wenige nekrotische Bereiche; Eiweiß- und Leukocytenzylinder; teilweise atrophische Tubulusepithelien
- 4+ = Erscheinungen wie oben beschrieben, stark ausgeprägt generalisiert; starke Parenchymzerstörungen; ev. multiple konfluierende Abszesse in Rinde und Mark; Glomerula meist ausgespart

Die Einzelbeurteilungen der Präparate nach dieser Einteilung sind den Tabellen 1-3, Spalte M und N zu entnehmen.

Die Kontrollnieren lassen für die retrograde Injektion manipulationsbedingte pathologische Veränderungen erkennen (1+ Stufe). Wie weit dies möglich ist, zeigen die Tiere 43 und 32, bei denen der rechte Ureter ligiert wurde. Für die direkte Injektion ergeben sich ähnliche Effekte, aber nur für die rechten Nieren. Dieses Grundmuster pathologischer Veränderungen, ist deshalb bei den Einteilungen zu berücksichtigen.

Beim Vergleich der HE Ergebnisse fällt auf, daß zwischen E. coli LPS und S. abortus equi LPS behandelten Nieren kein Unterschied im pathologischen Befund feststellbar ist. Innerhalb der verschiedenen Konzentrations- und Behandlungsgruppen für beide Endotoxine läßt sich aber eine Unterscheidung treffen. Die Nieren, die mit der 0,1 mg/ml Konzentration retrograd behandelt wurden, lassen pathologische Veränderungen erkennen, die kaum über die der

Kontrollgruppe hinausgehen. Im Vergleich mit der entsprechenden Gruppe, direkt injiziert, sind dort stärkere Veränderungen feststellbar.

Für die 1,0 mg/ml Konzentration sind die pathologischen Infiltrationen stark ausgeprägt (Skala 2+ - 3+). Für den retrograden Injektionsmodus scheint sich hier eine leicht verstärkte Reaktion abzuzeichnen. Nur die linken Nieren bei der direkten Methode zeigen ein pathologisches Bild, welches über dem der entsprechenden Kontrolltiere liegt (1+). Die mit lebenden *E. coli*-Keimen retrograd behandelten Tiere lassen in den rechten Nieren akute Pyelonephritiden (4+) mit teilweise starken Abszessen erkennen. Die linken Nieren sind nur gering von denen der Kontrollen abgrenzbar.

Veränderungen im Sinn einer Hydronephrose oder Nephrohydrose wurden in einigen Fällen registriert, die eine gute Übereinstimmung mit den makroskopischen Befunden ergaben (Spalten O, P im Vergleich zu Q). Es muß betont werden, daß die unter Kapitel II. beschriebenen Ergebnisse nicht statistisch abgesichert sind.

### III. Vergleiche der immunhistologischen mit den pathohistologischen Ergebnissen

Aus den Tabellen 1 und 2 ergeben die Spalten K und L im Vergleich mit M und N folgende Korrelation: Hohen Immunfluoreszenzwerten entsprechen in der Regel auch starke infiltrativ pathologische Prozesse. Bei niederen Werten ist diese Übereinstimmung nicht mehr zu erkennen. Die Konzentrationsabhängigkeit besteht in beiden Fällen (*E. coli*, *S. abortus equi*). Diese Ergebnisse weisen

eine Parallelität zwischen stark unterschiedlichen Mengen von LPS Antigen einer Spezies und der Schwere der entzündlichen Reaktion aus. Verschiebungen treten beim Vergleich von *E. coli* O:100 LPS und *S. abortus equi* LPS behandelten Nieren auf. Dem weniger nachweisbaren *S. abortus equi* Endotoxin entsprechen in vergleichbaren Gruppen pathologische Erscheinungen wie bei *E. coli*. Eine unterschiedliche Lokalisation der Infiltrate, wie bei der Immunfluoreszenz Antigenverteilung, ließ sich nicht feststellen. Zelluläre Infiltrate konnten auch bei der geringen Konzentration in allen Bereichen der Niere gefunden werden. Wie schon in den Gefrierschnitt-HF-Präparaten festzustellen war, stellt die fluoreszenzaktive zelluläre Invasion nur einen Bruchteil des gesamten pathologischen Geschehens dar. Aber immunologisch nachgewiesenem Antigen entsprachen auch in der Regel in dem parallelen HE Präparat entzündliche Reaktionen.

Unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Injektionsverfahrens - wie sie bei der Immunhistologie feststellbar sind - konnten bei der pathologischen Auswertung nicht eindeutig gemacht werden. Das direkte Injektionsverfahren erwies sich zur Erzeugung pathologisch entzündlicher Erscheinungen in der Niere als ebenbürtig.

Die Histopathologie zeigt somit nur Konzentrationsabhängige Unterschiede auf, während die Immunhistologie Abhängigkeiten bezüglich der Konzentration, der Speziesspezifität und der Injektionsart erkennen läßt. Als wichtiges Ergebnis ist zu erkennen, daß viel mehr Antigen in den mit *E. coli* LPS behandelten Nieren nachweisbar war als in denen mit *S. abortus equi*; bei fast gleichen patho-histologischen Bildern. Ob das *E. coli* O:100 Antigen

besser persistiert, besser penetriert oder weniger inaktiviert wird, kann nicht entschieden werden.

## F. DISKUSSION

Die retrograde Injektion zur Antigeneinbringung und Verteilung in der Rattenniere hat sich in Verbindung mit der hohen LPS Konzentration als eine gangbare, wenn auch nicht ganz einfache Methode erwiesen. Dies dokumentiert sich vor allem an den Stauungs-nephrosen, die in einigen Fällen auftraten (Tabelle 1 - 3, Spalte O,P). Die HE Histologie beinhaltet auf Grund dieser manipulationsbedingten Störungen den größten Unsicherheitsfaktor. Für die immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung haben sie wenig Bedeutung. Sarre (1966) beschreibt eine Induktion zur Pyelonephritis mit einer ähnlichen Methodik unter Verwendung von Enterokokkenvakzine. Diese Versuche liefen über einen längeren Zeitraum, und es ließen sich Schrumpfnieren erzeugen.

Die direkte Methode ergab in diesen Versuchen eine unzulängliche Verteilung des eingebrachten Endotoxins. Es konnte in größerer Konzentration in einigen Fällen nur im Bereich des Einstichkanals aufgefunden werden. Warum keine Antigenausbreitung gefunden wurde, kann nur vermutet werden. Durch den Einstich wurden immer Blutungen in der Niere hervorgerufen. Es ist möglich, daß die LPS, die eine hohe Affinität zu Erythrocyten besitzen (Neter et al., 1955), sofort an Blutanteile gebunden oder von Abwehrzellen inaktiviert werden. In dieses Bild paßt hinein, daß in den Gegennieren - wenn überhaupt - vor allem zellulär gebundene spezifische Fluoreszenz gefunden wurde. Auch in den HN

Schnitten ergaben sich für die direkte Injektion in der Gegenniere zelluläre Infiltrate.

Bezüglich der Antigenlokalisation im Bereich des Stichkanals und der zellulär gebundenen Fluoreszenz haben Aoki et al. (1967) ähnliche Ergebnisse mit abgetöteten Bakterien erhalten. Auch die HE Präparate zeigten eine allgemeine Verbreitung der Entzündungszellinfiltrate. Eine Übertragung spezifischer Fluoreszenz auf die Gegenniere konnten sie im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit nicht feststellen.

Die histologischen Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung zu den Arbeiten über experimentelle Pyelonephritiden (Cotran, 1963; Cotran et al., 1963; Dutz et al., 1965; Sarre, 1966; Aoki et al., 1967; Tuan et al., 1970). Unterschiede lassen sich im Grad der renalen Antwort im Sinn einer Pyelonephritis feststellen. Sie ist bei den verwendeten LPS durchweg geringer. Blutgefäßwandveränderungen waren außer bei den mit lebendem Antigen behandelten Nieren nicht zu registrieren. Die Reaktion auf die lebenden *E. coli* Bakterien war mit der hier verwendeten Methodik im Vergleich sehr stark. LPS Antigen oder pathologische Veränderungen an den Glomerula konnten nicht gefunden werden.

Bei der retrograden Applikation des LPS wurde Endotoxin über das ganze Nierengewebe verteilt. Wie eine solche Penetration aus dem Ureter- Beckenbereich für das molekulare LPS vorstellbar ist, kann nur hypothetisch betrachtet werden. Daß ein hämatogener Weg - wie von Tuan et al. (1970) bei lebenden Bakterien beschrieben - kaum in Frage kommt, ergibt sich aus der Tatsache, daß die

Konzentration in der Blase, der beschriebenen hämatogenen Eintrittspforte, relativ gering ist und daß Antigen und Invasionszellen oft im subepithelialen Beckengewebe gefunden wurden. Bei hämatogener Übertragung muß auf Grund der LPS Affinität zu Erythrocyten auch mit einer starken Absorption gerechnet werden. Ob bei einem direkten Übertritt aus dem Becken- oder Sammelröhrenlumen in das Nierengewebe ein Diffusionsvorgang oder ein aktiver Transport angenommen werden kann, ist offen. Gegen die letzte Ansicht spricht die Beobachtung, daß nur wenig spezifische Fluoreszenz in Epithelzellen gefunden wurde.

Die speziesbedingten Unterschiede der Immunfluoreszenz Ergebnisse könnten zwei Ursachen haben. Unterschiedliche Penetration oder Eliminierung des Endotoxins. Chemische oder strukturelle Unterschiede im molekularen Aufbau der LPS müssen dafür verantwortlich gemacht werden. Zu denken wäre an eine selektive Permeabilität, an eine verschiedene immunologische Inaktivierung mit anschließender Phagocytose oder an eine differente Affinität zum Nierengewebe, welche der E. coli LPS erlauben würde zu persistieren. Als weitere Ursache solcher verschiedenen LPS Werte muß auch die Methodik diskutiert werden. Trotz gleicher Präparationsbedingungen sehr unterschiedliche Immunfluoreszenzseren könnten ein ähnliches Bild vortäuschen. Dagegen sprechen die gleichmäßig ausgefallenen Spezifitätskontrollen, und die Ergebnisse des parallelen Auswertungsverfahrens. Im Vergleich der rein ausgezählten Immunfluoreszenzwerte, die von einer unterschiedlichen Spezifität und dem Konjugationsgrad der Seren weitgehend unabhängig sind, und der davon abhängigen Werte mit Beurteilung bestehen keine großen Relationsverschiebungen (siehe Kapitel E.I.1.

und Schaubilder 1 + 2).

Rowley (1971) beschreibt ein Modell - allerdings für intakte Zellwandstrukturen - zur Inaktivierung chemisch und strukturell differenter Bakterienkeime. Es wäre vorstellbar, daß sich solche Vorgänge auch am LPS Antigen (ev. am Gewebe fixiert) unterschiedlich auswirken würden.

Die Konzentrationsabhängigkeit des LPS Nachweises läßt sich in den Schaubildern 1, 2 und 4 ablesen; ebenso, wenn auch nicht so eindeutig, an der HE Auswertung (Tabelle 1 und 2, Spalte M und N). Überraschend an diesem Ergebnis ist die Beobachtung einer Konzentrationsabhängigen unterschiedlichen Verteilung der LPS Antigene. Bei der geringen Konzentration waren diese nur im Gewebe des Hilus, Sinus renalis und Beckenbereichs nachweisbar. Oft war das Endotoxin dort zellulär gebunden. Bei der hohen Konzentration konnte es im gesamten Gewebe gefunden werden, der zelluläre Anteil an spezifischer Fluoreszenz trat dort gegenüber dem freien Antigen stark zurück. Diese unterschiedliche Verteilung könnte auf eine im Hilusbindegewebe aktiv werdende zelluläre Abwehrschranke zurückzuführen sein, die in ihrer Kapazität bei der großen LPS Konzentration nicht mehr ausgereicht hat. Ob eine solche Schwelle auch bei einer natürlichen retrograden Infektion aufgebaut wird, oder hämatogen oder lymphogen umgangen werden kann (Tuan et al., 1970), müßte experimentell überprüft werden.

In den HE Präparaten konnte eine unterschiedliche, konzentrationsabhängige Verteilung von entzündlichen Infiltraten nicht gefunden

werden. Sie traten auch bei der niedrigen Konzentration über den gesamten Querschnitt verstreut auf. Inwieweit dies methodisch bedingte Effekte sind oder Ausdruck einer allgemein toxischen Wirkung des Endotoxins in der Niere, läßt sich nicht abgrenzen.

Gleichen pathologischen Erscheinungen für entsprechende Bedingungen konnten sowohl für die mit *E. coli* LPS, als auch für die mit *S. abortus equi* Endotoxin behandelten Tiere gefunden werden. Die Injektionsmethoden ergaben ebenfalls keine unterschiedlichen Bilder. Dies steht im Gegensatz zu den Immunfluoreszenzerggebnissen. Unterschiedlichem Vorhandensein von *E. coli* und *S. abortus equi* LPS in den Nieren entspricht einem ähnlichen akut-entzündlichen Geschehen. Ohne Berücksichtigung der immunologischen Ausgangslage (bei den Ratten war ein *E. coli* Antikörpertiter vorhanden, Schaubild 5), die nach mehreren Autoren einen Infektionsschutz bewirkt (Gottran et al., 1963; Hunter et al., 1964; Schäfer, 1966; Marget et al., 1972), muß man den *S. abortus equi* LPS zumindest gleiche, wenn nicht sogar stärkere pathologisch-toxische Eigenschaften zusprechen.

Da die beiden hier verwendeten Lipopolysaccharide Bakterienstämme repräsentieren, die in Beziehung zur Pyelonephritis starke Unterschiede aufweisen (Kienitz, 1966) (siehe Einleitung), liegt es nahe, diese Differenzen mit den obigen Ergebnissen zu korrelieren. *E. coli* Keime sind die häufigsten Erreger von Pyelonephritiden. Bei Kindern treten sie noch häufiger auf als bei Erwachsenen (Kienitz, 1966; Marget, 1972). Salmonellen kommen dagegen in der Ätiologie der Pyelonephritis kaum vor. Die bekannte

unterschiedliche Pyelonephritisaktivität könnte deshalb in einem Zusammenhang mit dem verschiedenen Persistieren von Lfs stehen.

Besonders heimtückisch ist der Verlauf der asymptomatischen, sterilen chronischen Pyelonephritis, die schon oft im Säuglingsalter erworben wird und sich erst sehr spät in Folge einer Niereninsuffizienz bemerkbar macht (Mildenberger et al., 1966; Angnell et al., 1968; Aoki et al., 1969). Die verschiedensten Beobachtungen deuten darauf hin, daß in der Pathogenese der Pyelonephritis eine immunologische Komponente eine starke Rolle spielt (Cotran, 1963; Dutz, 1965; Shirai, 1965; Sarre, 1966; Intorp, 1972; Klassen, 1972; Neter, 1972). Schäfer (1966) hat dies wohl am deutlichsten formuliert:

Bakterielles Antigen (keine lebenden Bakterien, Niere ist steril) persistiert im Niereninterstitium. Mit diesen Antigenen reagieren spezifische körpereigene Antikörper und Complement (immunhistologischer Nachweis). Histologisch können parallel dazu chronische Zellinfiltrationen nachgewiesen werden, die einen pathologischen Prozeß unterhalten. Es kann zu narbiger Schrumpfung und intrarenaler Obstruktion kommen. Diese sollen Reinfektionen begünstigen, und so zu den häufig zu beobachtenden Pyelonephritisrezidiven führen. Diese Primärreaktion kann über Hypertonieschäden in eine sekundäre immunologische Reaktion übergehen.

In dieses Modell, das in vielen Punkten sehr wahrscheinlich gemacht wurde, lassen sich die Versuchsergebnisse dieser Arbeit gut einfügen. Erst tierisches Material konnte nachgewiesen werden, daß im Modell mit Lfs in der Niere generell einen chronischen

Antikörpertiteranstieg. Pathohistologisch wurden Zellinfiltrationen im Bereich von lokalisierten Antigenen gefunden. Unter diesen Zellen waren Phagocyten, die Antigen inkorporiert hatten, und auch Zellen des Immunsystems (Lymphocyten, Plasmazellen). Inwieweit diese Antigenpositiv waren, ist nicht eindeutig. Möglich wäre eine Antigeninkorporation oder Adsorption. In manchen Fällen traten Lymphfollikel ähnliche Gebilde mit Plasmazellen im Zentrum auf, die eine starke immunologische Reaktion andeuteten. Intrarenale Obstruktionen konnten in Form von Nephrohydrosen im pathologischen Präparat gefunden werden. Geht man von der unterschiedlichen nachgewiesenen Antigenmenge bei *E. coli* und *S. abortus equi* behandelten Tieren aus, so muß man an Hand dieses Modells für *E. coli* eine stärkere Pathogenität in Bezug zur Pyelonephritis fordern - wie es ja auch tatsächlich der Fall ist.

Nach der kurzen Lebenszeit der Ratten kann noch keine abschließliche Reaktion in immunologischer und toxischer Hinsicht realisiert werden (ähnliche HE Bilder bei *E. coli* und *S. abortus equi*). Inwieweit diese Aktivitäten (siehe Einleitung) sich hier überlagern, muß offen bleiben.

#### G. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Zur späteren Überprüfung der Lipoid-A-Wirkung - einem Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) - auf die Harnwege, wurden im Tierversuch verschiedene Methoden erprobt.

Rechten Nieren von Wistaratten wurden zwei verschiedene Lipopolysaccharid-Konzentrationen von *Escherichia coli* (E.c.) und *Salmonella abortus equi* (S.a.e.) durch direkte Injektion in

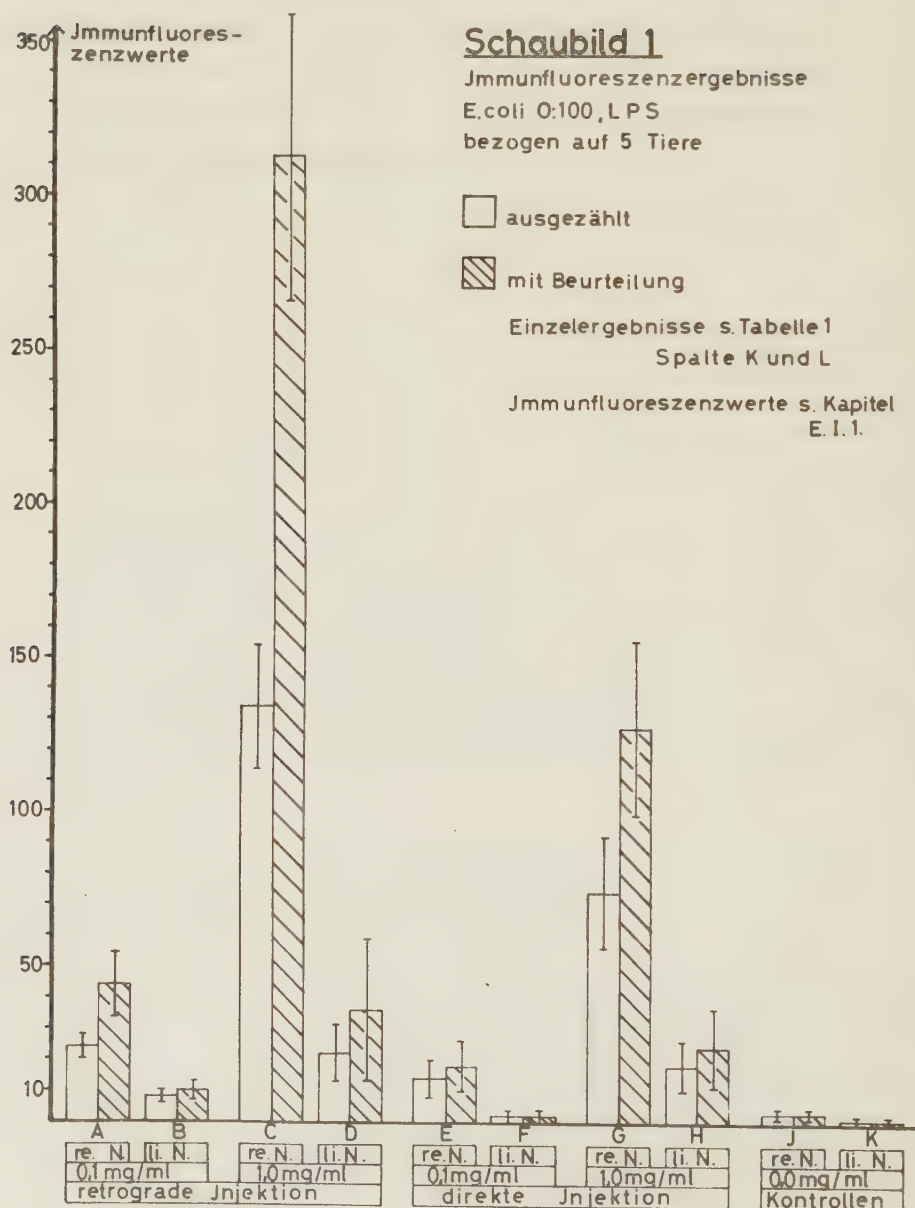
die Niere oder retrograde Injektion durch das Ureterostium (ascendierend) appliziert. Dabei erwies sich die Ureterinjektion als brauchbare Methode.

2. Die LPS Injektion bewirkte bei den Ratten eine Antikörpertitererhöhung. Die immunologische Antwort der Tiere ergab im Rahmen dieser Ergebnisse allerdings keine Beziehung zur Herkunft, Konzentration und Injektionsart des Endotoxins.
3. Spezifische Kaninchenserum (Ig-G Fraktion) gegen *Escherichia coli* E. coli O:100 und *Salmonella abortus equi* (S.a.e.) Antigen werden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert und zur Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet.
4. Die quantitative Auswertung der Immunhistologie ergibt, daß LPS in die behandelte Niere penetrieren kann und nur gering auf die Gegenniere übertragbar ist. Die nachweisbare Menge ist konzentrationsabhängig. *Escherichia coli* Endotoxin war in viel stärkerem Maße als *Salmonella abortus equi* LPS vorhanden. Die direkte Injektion erwies sich deutlich als unerheblicher.
5. Eine Verteilung des Antigens über den gesamten Nierenquerschnitt konnte bei retrograder Injektion in Verbindung mit der hohen LPS Konzentration beobachtet werden. In allen anderen Fällen beschränkte sich die Antigenlokalisation im wesentlichen auf das umgebende Gewebe von Hilus, Becken und Sinus renalis.

6. Immunfluoreszenzaktive Infiltrate (Phagocyten, Rundzellen) zeigten oft eine parallele Verteilung zu den Antigenlokalisationen in 5.
7. Nieren, bei denen lebende *E. coli* Keime zur Induktion verwendet wurden, reagierten in der Immunfluoreszenzmikroskopischen Auswertung im Gegensatz zu den LPS behandelten sehr viel stärker. Es war ungleich mehr Antigen vorhanden.
8. Zwischen den HE Ergebnissen von *S. abortus equi* und *E. coli* LPS behandelten Tieren besteht kein Unterschied. Viel mehr nachgewiesenes *E. coli* LPS (siehe 4.) zeigt somit gegenüber geringerem *S. abortus equi* LPS die gleichen pathologischen Bilder. Eine ausschließliche Verteilung von entzündlichen Infiltraten entsprechend der verschiedenen LPS Lokalisation (siehe 5.) konnte nicht registriert werden. Entzündungszellen wurden in allen Bereichen des Nierenquerschnittes gefunden. Die immunfluoreszenzaktiven entzündlichen Infiltrate stellten nur einen kleinen Anteil am gesamten Entzündungsgeschehen dar.
9. Nur die linken Nieren bei der direkten Injektion zeigten geringe histopathologische Veränderungen.
10. Mit lebenden *E. coli* Keimen wurden in den rechten Nieren Pyelonephritiden mit Abszessen induziert. Die entsprechenden linken Nieren zeigten dagegen Veränderungen, die das Kontrollniveau nur geringfügig überschritten.

11. An Hand der Ergebnisse werden die Möglichkeiten der Methode als Modell für eine eingehendere Untersuchung in dieser Richtung demonstriert. Das Interesse richtete sich bei dieser Pilot-Studie darauf, den Fragenkomplex der toxischen sowie immunologischen Bedeutung der Lipopolysaccharide bei der Pathogenese der chronischen Pyelonephritis in weiteren Untersuchungen zu verfolgen.

H. SCHAUBILDER, TABELLEN und FOTOS



## Schaubild 2

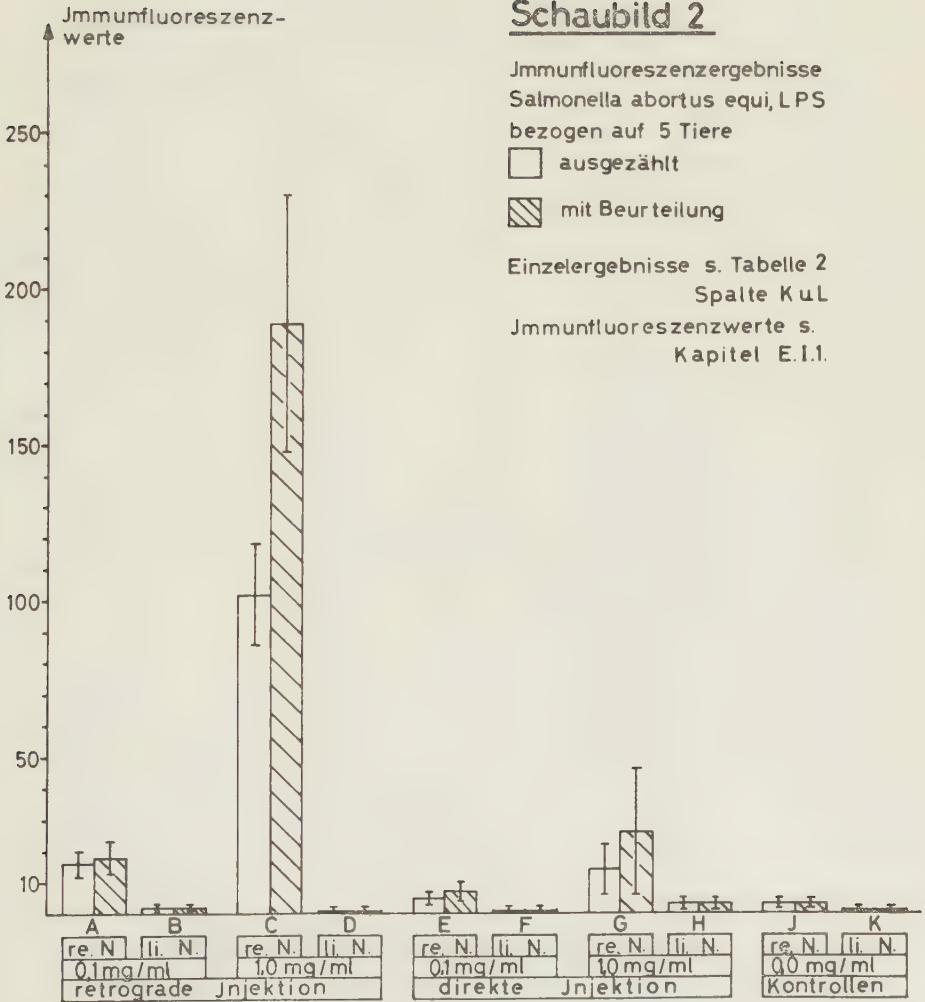
Immunfluoreszenzergebnisse  
*Salmonella abortus equi*, LPS  
bezogen auf 5 Tiere

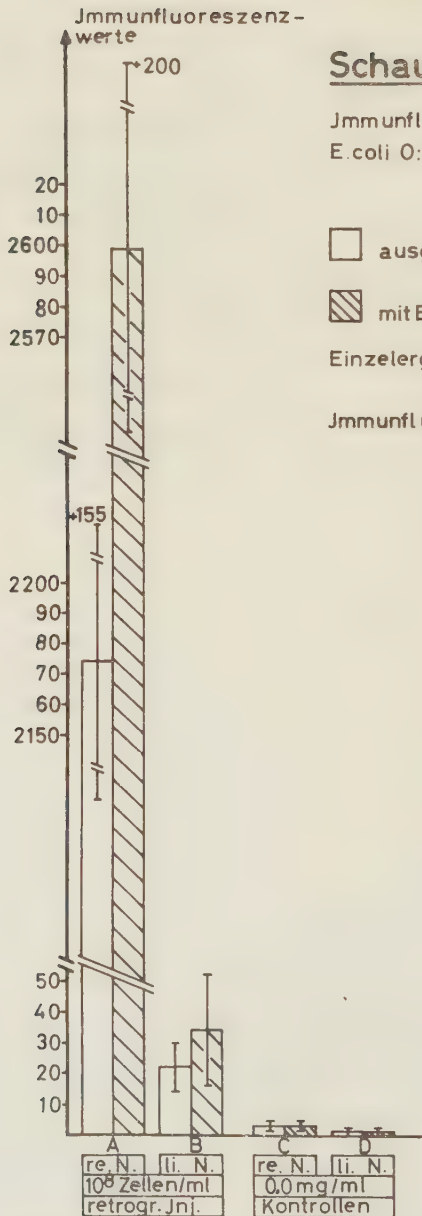
□ ausgezählt

▨ mit Beurteilung

Einzelergebnisse s. Tabelle 2  
Spalte KuL

Immunfluoreszenzwerte s.  
Kapitel E.I.1.





### Schaubild 3

Immunfluoreszenzergebnisse

E.coli O:100, lebend

bezogen auf 5 Tiere

□ ausgezählt

▨ mit Beurteilung

Einzelergebnisse s. Tabelle 1

Spalte K und L

Immunfluoreszenzwerte s.

Kapitel E.I.1.

## Schaubild 4

Immunfluoreszenzerggebnisse  
Vergleich *E.coli* O 100 LPS  
mit *S.abortus equi* LPS

□ *E.coli* O:100 Ergebnisse

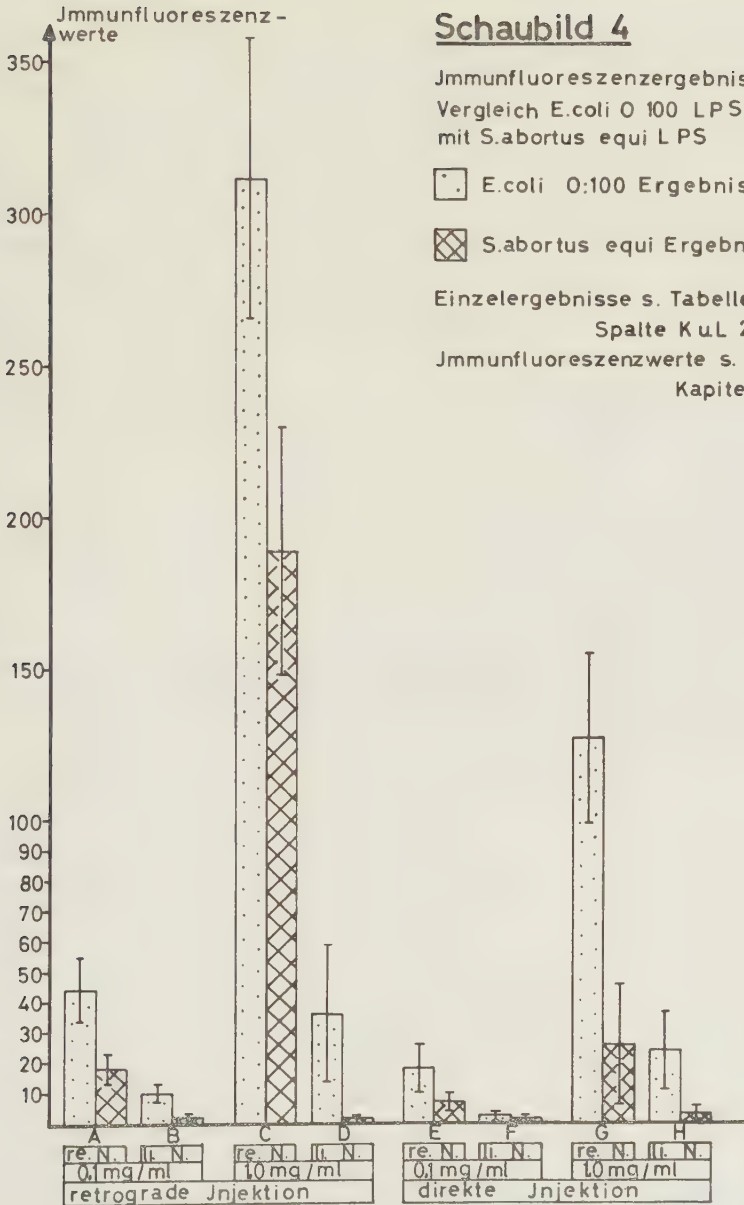
▣ *S.abortus equi* Ergebnisse

Einzelergebnisse s. Tabelle 1 u.2

Spalte KuL 2.Zahl

Immunfluoreszenzwerte s.

Kapitel E.I.1.





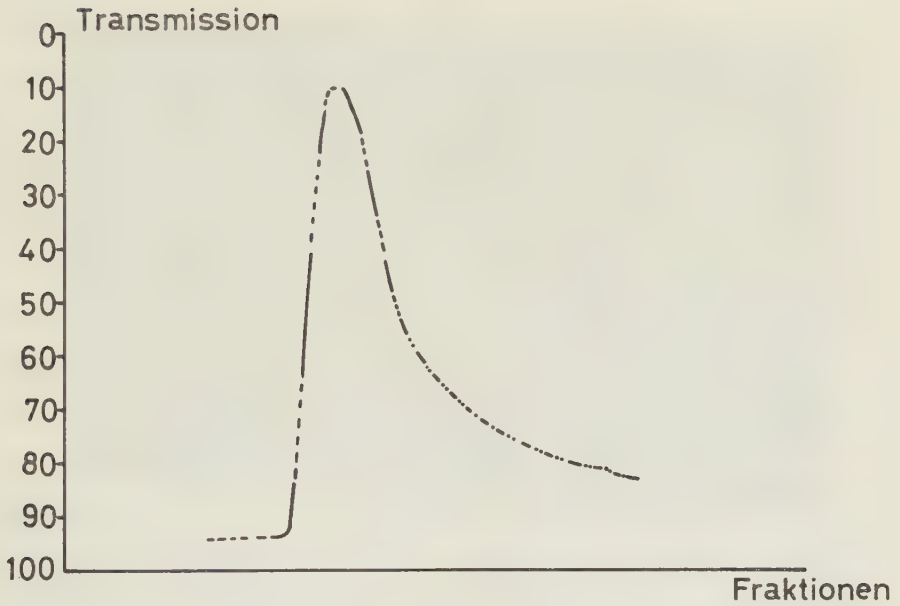


Schaubild 6, zu Methoden 10.3. Aufzeichnung der resultierenden Ig-G Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie an DEAE - Cellulose. E. coli O:100 Antiserum

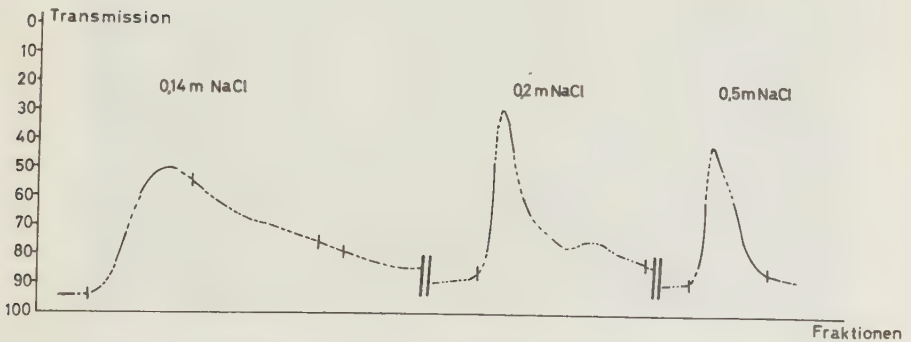


Schaubild 7, zu Methoden 11.4. Aufzeichnung der resultierenden Fraktionen von Ig-G verschiedener Konjugationsgrade mit FITC nach einem DEAE - Sephadex Lauf mit einem Puffer unterschiedlicher NaCl-Konzentration E. coli O:100 Antiserum

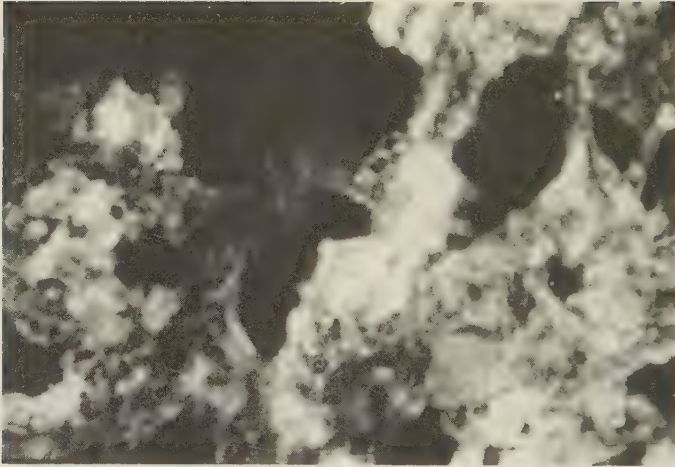


Foto 1: Ratte 79, rechte Niere; E. coli O:100 lebend, retrograd injiziert. Starke diffuse und schollige spezifische Fluoreszenz interstitiell im Mark. Die dunkel ausgesparten Zellkerne sind erkennbar. gefärbt: E. coli O:100 Immunfluoreszenzantiserum. vergrößert: 800 x (Öl). belichtet: 40 sec.

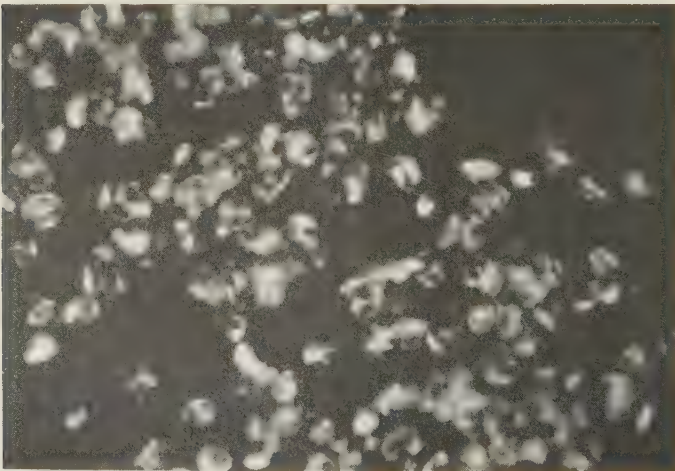


Foto 2: Ratte 65, rechte Niere; E. coli O:100 Lipopolysaccharid, retrograd injiziert. Leukocyteninvasion im Hilusgewebe mit teilweise starker spezifischer Fluoreszenz im Cytoplasma. Die Kerne sind dunkel ausgespart. gefärbt: E. coli O:100 Immunfluoreszenzantiserum. vergrößert: 800 x (Öl). belichtet: 30 sec.



Foto 3: Ratte 48, rechte Niere; *E. coli* O:100 Lipopolysaccharid, retrograd injiziert Makrophagen mit stark spezifischer granulärer Fluoreszenz im Cytoplasma. In der Mitte ist der ausgesparte Kern sehr deutlich zu erkennen. gefärbt: *E. coli* O:100 Immunfluoreszenzantiserum, vergrößert: 800 x (Öl) belichtet: 40 sec.

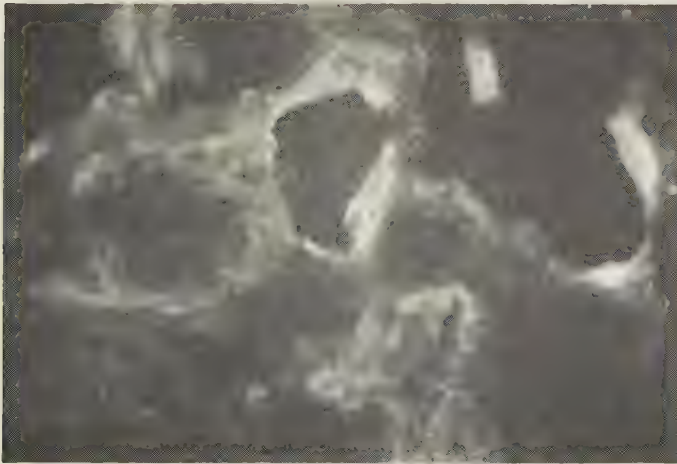


Foto 4: Ratte 50, rechte Niere; *E. coli* O:100 Lipopolysaccharid, retrograd injiziert. Spezifisch gefärbte Basalmembran im Mark der Niere. gefärbt: *E. coli* O:100 Immunfluoreszenzantiserum, vergrößert: 800 x (Öl). belichtet: 45 sec.

Tabelle 1: Daten der Ratten, die mit E. coli 0:100 LPS behandelt wurden und lebenden E. coli. Abkürzungen s. Tabelle 3

| Ratte<br>Nr. | Injektion       |           | Menge<br>ml | Blutent. |     |      | Lebens<br>Zeit<br>Tage | Urin | Hämaggl. titer |        |
|--------------|-----------------|-----------|-------------|----------|-----|------|------------------------|------|----------------|--------|
|              | Konz.<br>mg/ml  | LPS<br>µg |             | Art      | vor | nach |                        |      | vor            | nach   |
|              | A               | B         | C           | D        | E   | F    | G                      | H    | I              | J      |
| 3.           | 0,1             | 10        | 0,10        | r.       |     |      | 2                      | s.   |                |        |
| 6.           |                 | 25        | 0,25        |          |     |      | 6                      | s.   |                |        |
| 7.           |                 | 20        | 0,20        |          |     |      | 6                      | s.   |                |        |
| 9.           |                 | 20        | 0,20        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 10.          |                 | 15        | 0,15        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 11.          | 0,1             | 15        | 0,15        | r.       |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 13.          |                 | 14        | 0,14        |          |     |      | 8                      | s.   |                |        |
| 21.          |                 | 13        | 0,13        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 22.          |                 | 15        | 0,15        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 23.          |                 | 15        | 0,15        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 65.          | 0,1             | 15        | 0,15        | r.       | x   | x    | 8                      | s.   | 1/16           | 1/1024 |
| 66.          |                 | 15        | 0,15        |          | x   | x    | 8                      | s.   | 1/64           | 1/1024 |
| 67.          |                 | 15        | 0,15        |          | x   | x    | 8                      | in.  | 1/64           | 1/64   |
| 45.          | 1,0             | 150       | 0,15        | r.       | x   | x    | 9                      | s.   | 1/64           | 1/256  |
| 48.          |                 | 130       | 0,13        |          | x   | x    | 9                      | s.   | 1/128          | 1/8192 |
| 49.          |                 | 150       | 0,15        |          | x   | x    | 9                      | s.   | 1/32           | 1/512  |
| 50.          |                 | 120       | 0,12        |          | x   |      | 1/24                   | s.   |                |        |
| 51.          |                 | 120       | 0,12        |          | x   | x    | 8                      | s.   | 1/256          | 1/1024 |
| 60.          |                 | 180       | 0,18        |          | x   | x    | 7                      | s.   | 1/64           | 1/64   |
| 28.          | 0,1             | 15        | 0,15        | d.       |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 29.          |                 | 20        | 0,20        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 31.          |                 | 20        | 0,20        |          |     |      | 9                      | s.   |                |        |
| 64.          |                 | 15        | 0,15        |          | x   | x    | 8                      | s.   | 1/16           | 1/64   |
| 73.          |                 | 15        | 0,15        |          | x   | x    | 8                      | s.   | 1/64           | 1/128  |
| 32.          | 1,0             | 100       | 0,10        | d.       |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 33.          |                 | 100       | 0,10        |          |     |      | 7                      | s.   |                |        |
| 39.          |                 | 100       | 0,10        |          |     |      | 6                      | s.   |                |        |
| 56.          |                 | 150       | 0,15        |          | x   | x    | 6                      | s.   | 1/64           | 1/256  |
| 59.          |                 | 100       | 0,10        |          | x   | x    | 6                      | s.   | 1/64           | 1/128  |
| 76.          | E.c.            | lebend    | 0,10        | r.       | x   | x    | 3                      | in.  | 1/64           | 1/128  |
| 77.          | 10 <sup>8</sup> |           | 0,10        |          | x   | x    | 3                      | in.  | 1/32           | 1/32   |
| 78.          | Zellen          |           | 0,10        |          | x   | x    | 3                      | in.  | 1/16           | 1/16   |
| 79.          |                 |           | 0,10        |          | x   | x    | 3                      | in.  | 1/128          | 1/256  |
| 80.          |                 |           | 0,1         |          | x   | x    | 3                      | in.  | 1/256          | 1/128  |

| IT-Ergebnisse |        | HE - Ergebnisse |             | sonstige Diag. |        | Besonderes             |
|---------------|--------|-----------------|-------------|----------------|--------|------------------------|
| re. N.        | li. N. | PN-Einteilg.    | re.N. li.N. | re.N.          | li.N.  |                        |
| K             | L      | M               | N           | O              | P      | Q                      |
| 4/7           | 2/2    | 1+              | 1+          |                |        | Urin in Bauchhöhle     |
| 0/0           | 0/0    | 1+              | 1+          |                |        | Blase leicht gestaut   |
| 4/6           | 0/0    | 1+              | 0           |                |        | Blase leicht gestaut   |
| 4/4           | 0/0    | 1+              | 0           |                |        |                        |
| 12/30         | 0/0    | 3+              | 1+          |                |        |                        |
| 8/9           | 2/2    | 1+              | 0           |                |        |                        |
| 8/15          | 4/6    | 2+              | 1+          |                |        |                        |
| 4/10          | 4/4    | 2+              | 2+          |                |        |                        |
| 4/4           | 2/2    | 3+              | 1+          |                |        |                        |
| 4/4           | 2/6    | 0               | 0           |                |        |                        |
| 5/15          | 2/2    | 2+              | 1+          | HN, NH         |        |                        |
| 2/4           | 0/0    | 2+              | 1+          | HN, NH         |        |                        |
| 4/6           | 2/2    | 2+              | 0           | HN, NH         |        | re.N. leicht gestaut   |
| 12/42         | 5/5    | 2+              | 0           |                |        |                        |
| 17/43         | 2/2    | 3+              | 0           | HN             |        | re.N. leicht gestaut   |
| 30/46         | 0/0    | 3+              | 0           | NH             |        | re.N. leicht gestaut   |
| 34/72         | 7/7    | 1+              | 1+          |                |        |                        |
| 34/74         | 12/29  | 3+              | 0           | HN, NH         |        | re.N. leicht gestaut   |
| 34/98         | 0/0    | 1+              | 1+          |                |        |                        |
| 5/7           | 2/2    | 3+              | 1+          |                |        |                        |
| 6/8           | 0/0    | 2+              | 1+          |                |        |                        |
| 2/2           | 0/0    | 2+              | 1+          |                |        |                        |
| 1/1           | 0/0    | 0               | 0           |                |        |                        |
| 0/0           | 0/0    | 0               | 0           |                |        |                        |
| 5/5           | 0/0    | 3+              | 1+          |                |        |                        |
| 23/31         | 1/1    | 3+              | 1+          |                |        |                        |
| 8/22          | 6/8    | 2+              | 0           |                |        |                        |
| 24/35         | 2/2    | 0               | 0           |                |        |                        |
| 14/34         | 9/13   | 2+              | 0           |                |        |                        |
| 22/74         | 4/4    | 4+              | 1+          | HN, NH         |        | r.N. total abszediert  |
| total         | 1/1    | 4+              | 2+          | HN, NH         | NH     | re. N. abszediert      |
| 32/81         | 1/1    | 3+              | 2+          |                | HN, NH | r.N. leicht abszediert |
| total         | 6/8    | 4+              | 0           |                |        | r.N. total abszediert  |
| 120/444       | 10/20  | 3+              | 1+          | HN, NH         |        | r.N. abszediert        |

Tabelle 2: Daten der Ratten, die mit *S. abortus equi* LPS behandelt wurden, Abkürzungen s. Tabelle 3.

| Ratte<br>Nr. | Konz.<br>mg/ml | Injektion<br>LPS<br>µg | Menge<br>ml | Art | Blutent.<br>vor | Lebens<br>nach | Zeit<br>Tage | Urin<br>vor | Hämaggl<br>vor | titer<br>nach |
|--------------|----------------|------------------------|-------------|-----|-----------------|----------------|--------------|-------------|----------------|---------------|
|              | A              | B                      | C           | D   | E               | F              | G            | H           | I              | J             |
| 1.           | 0,1            | 25                     | 0,25        | r.  |                 |                | 2            | s.          |                |               |
| 4.           |                | 30                     | 0,30        |     |                 |                | 3            | in.         |                |               |
| 5.           |                | 20                     | 0,20        |     |                 |                | 6            | s.          |                |               |
| 16.          |                | 20                     | 0,20        |     |                 |                | 7            | s.          |                |               |
| 17.          |                | 20                     | 0,20        |     |                 |                | 8            | s.          |                |               |
| 25.          | 0,1            | 20                     | 0,20        | r.  |                 |                | 8            | in.         |                |               |
| 26.          |                | 18                     | 0,18        |     |                 |                | 8            | in.         |                |               |
| 69.          |                | 20                     | 0,20        |     | x               | x              | 8            | s.          | 0              | 1/128         |
| 70.          |                | 15                     | 0,15        |     | x               | x              | 8            | s.          | 0              | 1/16          |
| 75.          |                | 15                     | 0,15        |     | x               | x              | 3            | s.          | 0              | 1/8           |
| =====        |                |                        |             |     |                 |                |              |             |                |               |
| 30.          | 1,0            | 150                    | 0,15        | r.  |                 |                | 7            | s.          |                |               |
| 35.          |                | 160                    | 0,16        |     |                 |                | 7            | s.          |                |               |
| 53.          |                | 150                    | 0,15        |     | x               | x              | 8            | in.         | 0              | 1/64          |
| 54.          |                | 150                    | 0,15        |     | x               | x              | 8            | s.          | 0              | 1/16          |
| 61.          |                | 180                    | 0,18        |     | x               | x              | 7            | s.          | 1/16           | 1/64          |
| =====        |                |                        |             |     |                 |                |              |             |                |               |
| 2.           | 0,1            | 20                     | 0,20        | d.  |                 |                | 1            | s.          |                |               |
| 12.          |                | 20                     | 0,20        |     |                 |                | 2            | in.         |                |               |
| 19.          |                | 20                     | 0,20        |     |                 |                | 2            | s.          |                |               |
| 27.          |                | 15                     | 0,15        |     |                 |                | 7            | s.          |                |               |
| 55.          |                | 10                     | 0,10        |     | x               | x              | 7            | s.          | 0              | 0             |
| 63.          |                | 10                     | 0,10        |     | x               | x              | 7            | in.         | 0              | 1/64          |
| =====        |                |                        |             |     |                 |                |              |             |                |               |
| 34.          | 1,0            | 100                    | 0,10        | d.  |                 |                | 7            | s.          |                |               |
| 36.          |                | 200                    | 0,20        |     |                 |                | 7            | s.          |                |               |
| 37.          |                | 100                    | 0,10        |     |                 |                | 6            | s.          |                |               |
| 38.          |                | 100                    | 0,10        |     |                 |                | 6            | s.          |                |               |
| 62.          |                | 180                    | 0,18        |     | x               | x              | 7            | s.          | 0              | 1/512         |
| 72.          |                | 200                    | 0,20        |     | x               | x              | 8            | s.          | 0              | 1/32          |

| IE-Ergebnisse |       | HE - Ergebnisse |       |                |       | Besonderes                                      |
|---------------|-------|-----------------|-------|----------------|-------|-------------------------------------------------|
| re.N.         | li.N. | PN-Einteilg.    |       | sonstige Diag. |       |                                                 |
|               |       | re.N.           | li.N. | re.N.          | li.N. |                                                 |
| K             | L     | M               | N     | O              | P     | Q                                               |
| 4/4           | 0/0   | 1+              | 0     |                |       | Urin in Bauchhöhle<br>Blasenstau+Entzündung     |
| 2/2           | 0/0   | 1+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 0/0           | 0/0   | 1+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 7/11          | 2/2   | 2+              | 0     |                |       |                                                 |
| 8/8           | 0/0   | 2+              | 1+    |                |       | r.N.+Blase gestaut                              |
| 4/5           | 1/1   | 1+              | 1+    |                |       | Blasenstau                                      |
| 0/0           | 0/0   | 1+              | 0     |                |       |                                                 |
| 2/2           | 0/0   | 1+              | 0     | NH             |       | re.N. leicht gestaut<br>re.N. leicht vergrößert |
| 2/2           | 0/0   | 1+              | 0     | HN,NH          |       |                                                 |
| 2/2           | 0/0   | 1+              | 0     | HN,NH          |       |                                                 |
| =====         |       |                 |       |                |       |                                                 |
| 20/38         | 0/0   | -               | -     |                |       |                                                 |
| 32/64         | 0/0   | 3+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 19/29         | 0/0   | 2+              | 1+    | HN             |       |                                                 |
| 11/14         | 1/1   | 3+              | 0     | NH             |       | re.N. leicht gestaut                            |
| 20/44         | 0/0   | 2+              | 0     |                |       |                                                 |
| =====         |       |                 |       |                |       |                                                 |
| 2/2           | 0/0   | 1+              | 0     |                |       | li.N. ligiert                                   |
| 0/0           | 0/0   | 1+              | 2+    |                |       | Blase entzündet                                 |
| 0/0           | 0/0   | 2+              | 0     |                |       | li.Ureter verletzt                              |
| 0/0           | 0/0   | 2+              | 0     |                |       |                                                 |
| 2/2           | 0/0   | 0               | 1+    |                |       |                                                 |
| 2/5           | 1/1   | 2+              | 1+    |                |       |                                                 |
| =====         |       |                 |       |                |       |                                                 |
| 4/4           | 1/1   | 2+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 1/1           | 0/0   | 2+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 11/25         | 2/3   | 2+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 1/1           | 0/0   | 2+              | 2+    |                |       |                                                 |
| 0/0           | 0/0   | 1+              | 1+    |                |       |                                                 |
| 0/0           | 0/0   | 1+              | 0     |                |       | re.N. leicht gestaut                            |
| =====         |       |                 |       |                |       |                                                 |

Tabelle 3: Kontrollen: behandelt mit physiologischer Kochsalzlösung oder nur Ureterligatur

| Ratte<br>Nr. | Injektion      |           |             | Blutent. |     |      | Lebens<br>Zeit<br>Tage | Urin | Hämaggl.<br>vor | titer<br>nach |
|--------------|----------------|-----------|-------------|----------|-----|------|------------------------|------|-----------------|---------------|
|              | Konz.<br>mg/ml | LPS<br>µg | Menge<br>ml | Art      | vor | nach |                        |      |                 |               |
|              | A              | B         | C           | D        | E   | F    | G                      | H    | I               | J             |
| 42.          | 0,9 % ige      |           | 0,15        | r.       | x   | x    | 6                      | s.   | 0               | 0             |
| 44.          | NaCl-Lsg.      |           | 0,15        |          | x   | x    | 6                      | in.  | 1/16            | 1/16          |
| 81.          |                |           | 0,18        |          | x   | x    | 8                      | in.  | 1/32            | 1/32          |
| 83.          |                |           | 0,20        |          |     |      | 7                      | s.   |                 |               |
| 84.          |                |           | 0,15        |          |     |      | 7                      | s.   |                 |               |
| 85.          |                |           | 0,15        |          |     |      | 7                      | s.   |                 |               |
| =====        |                |           |             |          |     |      |                        |      |                 |               |
| 40.          | 0,9 % ige      |           | 0,15        | d.       | x   | x    | 8                      | s.   | 1/128           | 1/128         |
| 41.          | NaCl-Lsg.      |           | 0,15        |          | x   | x    | 8                      | s.   | 1/256           | 1/256         |
| 74.          |                |           | 0,20        |          | x   | x    | 8                      | s.   | 1/32            | 1/128         |
| =====        |                |           |             |          |     |      |                        |      |                 |               |
| 43.          | re.Ureter      | ligiert   |             |          | x   | x    | 6                      | s.   | 1/512           | 1/512         |
| 82.          | re.Ureter      | ligiert   |             |          |     |      | 7                      | s.   |                 |               |
| =====        |                |           |             |          |     |      |                        |      |                 |               |

Abkürzungen der Tabellen 1 - 3:

r. = retrograde Injektion  
 d. = direkte Injektion  
 s. = steril  
 in. = insteril  
 x = Blutentnahme vor der Operation oder nachher zum Tötungszeitpunkt  
 IF = Immunfluoreszenz  
 HE = Hämalaun - Posin  
 PN = Pyelonephritis  
 re. N. = rechte Niere  
 li. N. = linke Niere  
 HN = Hydronephrose  
 NH = Nephrohydrose

IF - Ergebnisse: Bedeutung der Relativwerte siehe Kapitel E.I.1.  
 PN - Einteilung : Skala siehe Kapitel E.II.

| IF-Ergebnisse |       | HE - Ergebnisse       |                   |                |       | Besonderes           |
|---------------|-------|-----------------------|-------------------|----------------|-------|----------------------|
| re.N.         | li.N. | IN-Einteilg.<br>re.N. | sonstige<br>li.N. | Diag.<br>re.N. | li.N. |                      |
| K             | L     | M                     | N                 | O              | P     | Q                    |
| 3/3           | 1/1   | 1+                    | 1+                |                |       | Wunde entzündet      |
| 0/0           | 0/0   | 1+                    | 1+                |                |       | Wunde entzündet      |
| 1/1           | 1/1   | 1+                    | 0                 | HN,NH          | HN,NH | r.N.+Blase gestaut   |
| 2/2           | 0/0   | 1+                    | 2+                |                | HN,NH | Blase leicht gestaut |
| 0/0           | 1/1   | 1+                    | 1+                |                |       |                      |
| 0/0           | 0/0   | 1+                    | 0                 |                |       |                      |
| =====         |       |                       |                   |                |       |                      |
| 0/0           | 0/0   | 1+                    | 0                 |                |       |                      |
| 0/0           | 0/0   | 0                     | 0                 |                |       |                      |
| 0/0           | 0/0   | 1+                    | 0                 |                |       |                      |
| =====         |       |                       |                   |                |       |                      |
| 0/0           | 0/0   | 1+                    | 1+                | HN             |       | r.N.gestaut, Tier    |
| C/O           | 0/0   | 1+                    | 0                 | HN,NH          |       | r.N.gestaut trächtig |

# I. LITERATURVERZEICHNIS

- Angnell, M.E.; A.S. Relman; S.L. Robbins: "Active" chronic pyelonephritis without evidence of bacterial infektion.  
New. Engl. J. Med. 278, 1303 (1968)
- Aoki, S.; S. Imamura; M. Aoki; W.R. McCabe: Abacterial and bacterial pyelonephritis. Immunofluorescent lokalisation of bacterial antigen.  
New. Engl. J. Med. 281, 1376 (1969)
- Aoki, S.; M. Merkel; M. Aoki; W.R. McCabe: Immunofluorescent localisation of bacterial antigen in pyelonephritis.  
I. The use of antisera against the common enterobacterial antigen in experimental renal lesions.  
J. of Lab. Clin. Med. 70, 204 (1967)
- Arana, J.A.; U.M. Kozij; G.G. Jackson: The immunological status of the host and pyelonephritis: A study of retrograde E.c. urinary infection in rats.  
J. of Immunology 94, 337 (1965)
- Cockett, A.T.K.; A.P. Roberts; R.S. Moore: Evidence for two intrarenal lymphatic networks.  
Invest. Urol. 7, 266 (1970)
- Coons, A.H.; H.J. Creech; R.N. Jones: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.  
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 47, 200 (1941)
- Coons, A.H.; H.J. Creech; R.N. Jones; E. Berliner: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.  
J. Immunol. 45, 159 (1942)
- Cotran, R.S.: Retrograde Proteus pyelonephritis in rats. Localisation of antigen and antibody in treated sterile pyelonephritic kidneys.  
J. Exp. Med. 117, 813 (1963)
- Cotran, R.S.; L.D. Thrupp; S.N. Haij; D.F. Zangwill; E. Vivaldi; F.H. Kass: Retrograde E. coli pyelonephritis in the rat: A bacteriologic, pathologic and fluorescent antibody study.  
J. Lab. Clin. Med. 61, 987 (1963)
- Daum, S.: pers. Mitteilung
- Dedmon, R.E.; A.W. Holmes; F. Deinhard: Preparation of fluorescein isothiocyanatelabeled  $\gamma$ -globulin by dialysis, gel-filtration and ion-exchangechromatography in combination.  
J. of Bacteriology 89, 734 (1965)
- Dieterich, H.J.; W. Kriz: Interstitium und Lymphgefäße in der Säugerniere.  
In: Pyelonephritis, Bd. III, Hrsgb. K. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
- Dutz, W.; B. Ernst; I. Hagemann; M. Jacob; P. Rode; E.-F. Ziegler: Immunhistologische, histologische und bakteriologische Untersuchungen der akuten experimentellen Coli-Pyelonephritis der Ratte bei Behandlung mit Sulfaisomidiazin und Prednisolon.  
Acta biol. med. german. 15, 480 (1965)
- Fuchs, T.: Pyelonephritis - Diagnostik und Therapie.  
In: Studienreihe Boehringer, Mannheim (1969)

- Mukazawa, Y.; T. Shinoda; T. Yomoda; T. Tsuchiya: Antibody response to bacterial antigens: Characteristics of antibody response to somatic antigens of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 1, 249 (1970)
- Galanos, L.: Endotoxin Conference, Warrenton, Virginia, 1972
- Galanos, C.; E. Rietschel; O. Lüderitz; O. Westphal: Interaction of lipopolysaccharides and lipid-A with complement. *Eur. J. Biochem.* 19, 143 (1971)
- Göppert, H.: Über die citrigen Erkrankungen der Harnwege im Kindesalter. *Ergeb. inn. Med. Kinderheilkunde* 2, 30 (1908)
- Holmgren, J.; L.A. Hanson; U. Jodal; B. Kaijser; J. Winberg: Studies of the antibody response to *E. coli* in children with urinary tract infection and its possible protective implications as analysed in experimental animals. *In: Pyelonephritis*, Bd. III, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
- Hunter, B.W.; L.L. Atkins; J.P. Sanford: The role of immunity in the pathogenesis of experimental retrograde pyelonephritis. *J. Exp. Med.* 119, 869 (1964)
- Intorp, H.W.; H. Loew; H. Christ; H. Losse: Immunologische Phänomene bei Pyelonephritis im Tierexperiment. *In: Pyelonephritis*, Bd. III Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
- Kass, E.H.: Bacterial antigen in the kidney. *New Engl. J. Med.* 281, 1420 (1969)
- Kauffmann, F.: The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Kopenhagen, 2. Aufl. (1966)
- Kienitz, M.: Ätiologie und Pathogenese der Pyelonephritis. *Bakteriologische Grundlagen*. *In: Pyelonephritis*, Bd. I, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- Klassen, J.; R.T. McCluskey; F. Milgrom: Nonglomerular renal disease produced by immunological means. *In: Pyelonephritis*, Bd. III, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
- Lüderitz, O.: Neuere Ergebnisse zur Biochemie der Zellwand Lipopolysaccharide von *Salmonella* Bakterien. *Angew. Chem.* 82, 708 (1970)
- Malchow, D.; O. Lüderitz; B. Kickhöfen; O. Westphal; G. Gersch: Polysaccharides in vegetative and aggregation-competent amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 2, 239 (1969)
- Marget, W.: Behandlung der Harnwegsinfektionen im Kindesalter. *Med. Klin.* 67, 1168 (1972)
- Marget, W.; H. Schöll; M. Huppke; H. Zeller: Konkurrenzphänomene von Immunsuppressiva und Chloramphenicol bei experimenteller Pyelonephritis. *In: Pyelonephritis*, Bd. III, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
- McCabe, W. R.: Tolerance to bacterial endotoxin produced by proliferation of Gram negative bacteria in the kidney. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 402 (1961)

- Meier, : Dissertation, Univ. München, unveröffentlicht
- Mildenberger, H.; H. Fendel; W. Marget: Langzeitkatamnesen nach Harnwegsentzündungen im Säuglings- und Kindesalter. In: Pyelonephritis, Bd. I, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- Neter, E.: Antibody response of patients with infection of the urinary tract: Aid to understanding of pathogenesis, and to diagnosis and prognosis. In: Pyelonephritis, Bd. III Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
- Neter, E.; O. Westphal; O. Lüderitz; R. M. Gino; E. A. Gorzynski: Demonstration of antibodies against enteropathogenic *E. coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* 16, 801 (1955)
- Neter, E.; O. Westphal; O. Lüderitz; E. A. Gorzynski: The bacterial haemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 66, (1956)
- Nowotny, A.: Relationship of structure and biological activity of bacterial endotoxins. *Naturwissenschaften* 58, (1971)
- Pielsticker, K.: pers. Mitteilung
- Prát, V.: Ätiologie und Pathogenese der Pyelonephritis. Die Infektionswege. In: Pyelonephritis, Bd. I, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- Prát, V.; Benšová, D.; L. Pávková; F. Šervinka: The relationship of urinary obstruction to experimental chronic pyelonephritis in the rabbit. *Acta med. scand.* 165, 305 (1959)
- Rank, W. R.: Untersuchung zur Antikörper-Biosynthese. Dissertation, Univ. München (1969)
- Rank, W. R.; U. Flügge-Rank: Genetics of the lipid-A-Dependent effects of endotoxins in mice. Vortrag 3. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Marburg (1971)
- Rietschel, E. Th.; O. Galanos; O. Lüderitz; O. Westphal: Chemische und biologische Untersuchungen am Glykolipid (Endotoxin) der *Salmonella minnesota* Mutante R 595. Vortrag auf der 3. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Marburg (1971)
- Rohwedder, H. J.: Ätiologie und Pathogenese der Pyelonephritis. Prädisponierende Faktoren. In: Pyelonephritis, Bd. I, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- Rowley, D.: Endotoxins and bacterial virulence. *J. of Infec. Dis.* 123, 317 (1971)
- Sanford, J. F.; B. W. Hunter; L. L. Atkins; J. A. Barnett: Immunity and obstructive uropathy as determinants in the pathogenesis of experimental pyelonephritis with observations on the distribution of antibody in hydronephrotic kidneys. In: Progress in pyelonephritis, Hrsgb. L. Fass, Philadelphia (1965)
- Sanford, J. F.; B. W. Hunter; L. L. Atkins; J. A. Barnett: Immunity in the pathogenesis of experimental hemolytic pyelonephritis. *J. Exp. Med.* 115, 383 (1962)

- Sarre, H.: Experimentelle Erzeugung einer pyelonephritischen Schrumpfniere durch abgetötete Interokokken und Kolibakterien.  
In: Pyelonephritis, Bd. I, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- Schäfer, H. E.: Humorale Abwehrreaktionen bei bakterieller Pyelonephritis.  
In: Pyelonephritis, Bd. I, Hrsgb. H. Losse und M. Kienitz, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- Shirai, P.; F. D. Miller; E. A. H. Sinus: Increased susceptibility to ascending pyelonephritis of rats with nephrotoxic antiserum nephrosis.  
In: Progress in pyelonephritis, Hrsgb. E. Kass, Philadelphia (1965)
- Spasov: pers. Mitteilung.
- Tacness, G.: pers. Mitteilung.
- Tuan, H.; E. Friedigkeit; G. Dietscherlein; W. Dutz; I. Hagemann; J. Thilo: Über den Infektions- und Ausbreitungsweg von *E. coli* in den Nieren bei experimenteller Rattenpyelonephritis.  
Acta biol. med. germ. 25, 679 (1970)
- Watson, D. W.; Y. B. Kim: In: Bacterial endotoxins, Hrsgb. M. Landy und W. Braun, Rytgers University Press (1964)
- Westphal, O.; O. Lüderitz: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien.  
Angew. Chemie 66, 407 (1954)
- Westphal, O.; O. Lüderitz; F. Bister: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser.  
Z. Naturforsch. 7b, 148 (1952)
- Westphal, O.; E. Rietschel; C. Galanos; O. Lüderitz: Was ist Endotoxin? Chemie und Wirkungsweise.  
Vortrag, XIII. Internat. Congr. Pädiat. Wien, 1971
- Wichmann, U.; W. Marget: Parameter zur Diagnose akuter Schübe von chronischer Pyelonephritis im Kindesalter.  
Arch. für Kinderheilkunde 182, 245 (1971)
- Winberg, J.; T. Bergstrom; L. A. Hanson: Neue Gesichtspunkte zur Harnwegsinfektion mit *E. coli*.  
Mschr. f. Kinderheilk. 119, 506 (1971)

## J. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. A. Marget möchte ich für die freundliche Überlassung der Promotionsarbeit, seine Hilfe und für die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Dr. M. Westenfelder danke ich für seinen Rat, seine chirurgische Unterstützung bei den Tierexperimenten und für die Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. G. Thoeness bin ich sehr verpflichtet für die freundliche Aufnahme und Unterstützung als Gast in seinem Labor bei der Herstellung der Immunfluoreszenzseren. Mein Dank gilt auch seinen Mitarbeitern, besonders Url. G. Meyer.

Herrn Dr. K. Fielsticker gilt mein Dank ebenfalls für das Gastrecht, das ich in seinem Labor genießen durfte, für seine Hilfsbereitschaft und für die Beurteilung der histologischen Präparate. Herrn Dr. E. Baum möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Url. Mielert für die Herstellung der histologischen Präparate danken.

## K. LEBENS LAUF

Am 21.6.1943 wurde ich als drittes Kind des Gastwirtes Karl Bein-  
ker und seiner Ehefrau Else, geb. Thies, in Bad-Essen (Kreis Witt-  
lage) geboren. Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in  
Holte (Kreis Osnabrück), wechselte dann auf das naturwissenschaft-  
liche Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Osnabrück, wo ich 1964 das  
Abitur ablegte.

In Bonn, Tübingen und München studierte ich Biologie. 1967 legte  
ich die Vordiplomprüfung, 1968 die Hauptdiplomprüfung ab. An-  
schließend arbeitete ich bis 1969 an meiner Diplomarbeit im Fach  
Genetik. Nach deren Fertigstellung begann ich das Studium der  
Zahnmedizin an der Universität München, bestand 1970 die zahn-  
ärztliche Vorprüfung und bin jetzt - im Frühjahr 1973 - dabei,  
das Staatsexamen abzulegen.





